

**Interaktion zwischen dem humanen Cytomegalievirus,
Aspergillus fumigatus, dendritischen Zellen
und neutrophilen Granulozyten**



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Markus Mezger
aus Marbach am Neckar

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

05. November 2007

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

1. Gutachter: PD Dr. Jürgen Löffler

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Hacker

Tag des Promotionskolloquiums:

23. April 2008

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Erklärungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Institut für Molekulare Infektionsimmunologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit

Interaktion zwischen dem humanen Cytomegalievirus, *Aspergillus fumigatus*, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit noch nicht in einem anderen Studiengang als Prüfungsleistung verwendet wurde, und ich mit Ausnahme des Titels Diplom-Biologe keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 2007

Markus Mezger

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit, die in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Tübingen / Würzburg in der Zeit von Oktober 2004 bis Oktober 2007 angefertigt wurde, in der hier vorliegenden Form entstehen konnte.

Als erstes sei Herr **Prof. Dr. med. Hermann Einsele** genannt, dem mein besonderer Dank für die Vergabe dieser Doktorarbeit gilt. Ich durfte in seinem Labor ein äußerst interessantes, spannendes und aktuelles Thema von großer medizinischer Relevanz bearbeiten.

An nächster Stelle sei Herr **PD. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler** erwähnt. Im Laufe meiner Doktorarbeit konnte ich ein breites Spektrum an zellbiologischen, molekularen und immunologischen Methoden kennen lernen und erlernen. Dank bekunden möchte ich für die Chance zum selbstständigen Arbeiten, die Offenheit für neue Ideen und für die Möglichkeit, im Rahmen mehrerer Veröffentlichungen mitwirken zu können.

Herrn **Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker** vom **Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg** gilt mein Dank für die Übernahme der Zweitbetreuung und das stetige Interesse am Fortgang der Arbeit.

Besondere Erwähnung soll Frau **Dipl.-Biol. Iwona Wozniok** finden, die im selben Zeitraum ihre Doktorarbeit gemacht hat, und somit alle Schwierigkeiten miterlebt hat, die die dreimaligen Umzüge in jeweils neue Laborräume mit sich gebracht haben. Vielen Dank für die gegenseitige Unterstützung und die hervorragende Zusammenarbeit, die diese Zeit geprägt hat.

Für das Überlassen des humanen Cytomegalievirusstammes TB40E, die hilfreichen Tipps zur Virusgewinnung und die DC-Infektionsversuche möchte ich mich ganz herzlich beim **Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten der Universität Tübingen (Dipl.-Biol. Tobias Kessler)** bedanken.

Zu außerordentlichem Dank bin ich dem **Institut für Virologie der Universität Würzburg (Dr. med. Benedikt Weißbrich)** verpflichtet, die es mir ermöglicht haben, ein Zellkultursystem zur Virusanzucht zu etablieren. In dieser Zeit war Frau **MTA Barbara Scheiner** eine unentbehrliche Unterstützung und ausgezeichnete Ratgeberin. Daran schließt sich auch ein Dankeschön für das **Institut für Virologie der Universität Erlangen (Prof. Dr. rer. nat. Michael Mach)** an, wo mir Frau **MTA Barbara Kropff** die Bestimmung von Virustitern gezeigt hat.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau **Dr. rer. nat. Susanne Kneitz** von der **IZKF Microarray Facility der Universität Würzburg** für die hervorragende Expertise und Unterstützung bei der Auswertung der Micro-Array Daten. Ihre freundliche Art habe ich sehr genossen.

Herrn **Dr. rer. nat. Mohammad-Reza Toliat** vom **Cologne Centre for Genomics in Köln** danke ich für die Genotypisierungen im Rahmen der SNP-Analyse zur Identifikation von genetischen Risikoallelen für eine invasive Aspergillose. Im Zuge dessen sei auch Herr **Dr. med. Michael Steffens** vom **Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn** genannt, der die statistischen Signifikanztestungen vorgenommen hat.

Dank gebührt auch Herrn **Dipl. Biochem. Markus Kapp** für die Unterweisung in die Kunst der Durchflusszytometrie und Herrn **Dr. med. Götz Ulrich Grigoleit (Universitätsklinikum Würzburg)** für die Ratschläge bei der Generierung von dendritischen Zellen.

Der Dank unserer gesamten Arbeitsgruppe gebührt dem **Institut für Klinische Biochemie der Universität Würzburg** für die Gastfreundschaft, auch über das halbe Jahr hinaus, in dem wir im Auvera Haus als Gäste immer willkommen waren. Vielen Dank, **Gunnar-Ingi Kristjansson** und **Prof. Dr. rer. nat. Michael Zimmer**, für die Hilfe mit dem MALDI-TOF-MS zur SNP Analyse.

Ferner seien alle anderen im Labor tätigen Personen (**Christian Blockhaus, Johannes Eberle, Dipl.-Biol. Anke Hornbach, Katrin Spinnler, Carolin Manger, Marlene Butters, Astrid Müller, Melanie Beyer, Doreen Killian ...**) aufgeführt, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und immer dafür gesorgt haben, dass es nie langweilig wurde. ☺

Außerordentlicher Dank gebührt meinen **Eltern Erich** und **Irmgard Mezger** und meinem Bruder **Alexander Mezger**, die mir immer Rückhalt geboten haben. Sie waren zu jeder Zeit eine großartige Unterstützung für mich.

Ganz speziell erwähnen möchte ich noch meine **Freundin Helena Gloc**. Ihre Liebe, ihr Verständnis und ihre Verlässlichkeit waren eine unentwegte Unterstützung für mich. Vielen Dank, dass Du mit mir nach Würzburg gekommen bist! Du machst mich sehr glücklich!

**Allen im Labor wünsche ich weiterhin viel Erfolg bei Ihrer Arbeit!
... auf der Suche nach neuen Erkenntnissen!**

<u>1</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>1</u>
1.1	Kurzfassung deutsch	1
1.2	Summary	3
<u>2</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>6</u>
2.1	Das humane Cytomegalievirus (HCMV)	6
2.1.1	Taxonomie, Prävalenz und Pathogenese	6
2.1.2	Genomorganisation und Aufbau des Viruspartikels	7
2.1.3	Virus Adhäsion, Penetration und Replikation	8
2.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	10
2.3	Das angeborene Immunsystem	12
2.4	Toll-like Rezeptoren	13
2.4.1	Historisches	13
2.4.2	Ligandenspektrum der TLRs	14
2.4.3	Signaltransduktion	17
2.4.4	Expression und Lokalisation der TLR	19
2.5	C-Typ Lektine und Pentraxine	19
2.6	Dendritische Zellen	22
2.7	RNA-Interferenz	24
2.7.1	Historisches	24
2.7.2	Wirkungsmechanismus	25
2.8	Immunsuppressiva	27
2.9	Ziele der Arbeit	28

3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	30
3.1	Geräte	30
3.2	Verbrauchsmaterialien	31
3.2.1	Labormaterialien	31
3.2.2	Kits.....	32
3.2.3	Reagenzien	32
3.2.4	Lösungen und Puffer	34
3.2.5	Medien.....	35
3.2.6	Cytokine und Immunsuppressiva	35
3.2.7	TLR-Liganden	35
3.2.8	Primer	36
3.2.9	Sonden	37
3.2.10	siRNAs.....	38
3.2.11	Antikörper	40
3.3	Arbeiten mit HCMV	41
3.3.1	Kultivierung von humanen Fibroblasten	41
3.3.2	Anzucht von HCMV in Fibroblasten	42
3.3.3	Viruskonzentrierung	42
3.3.4	Virustitration nach der Endpunktverdünnungsmethode.....	43
3.3.5	Infektion von Immunzellen	43
3.3.6	Cytospin-Präparation und Immunfluoreszenzfärbungen	44
3.4	Arbeiten mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	45
3.5	Arbeiten mit Immuneffektorzellen	45
3.5.1	Isolierung von PBMC's.....	45
3.5.2	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer	46
3.5.3	Isolierung von CD14-positiven Zellen mittels MACS-System	47
3.5.4	Generierung von dendritischen Zellen	47
3.5.5	Isolierung von Granulozyten.....	48
3.5.6	<i>Oxidativer Burst</i>	49
3.5.7	Durchflusszytometrie	50
3.5.8	Intrazelluläre FACS-Analyse	50
3.5.9	Elektroporation.....	51
3.5.10	Phagozytose-Assay und DAPI-Färbung	51

3.6	Arbeiten mit RNA und DNA.....	52
3.6.1	Isolierung von Total-RNA aus humanen Zellen	52
3.6.2	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	53
3.6.3	Umschreibung von RNA in cDNA.....	53
3.6.4	Quantitative <i>Realtime</i> PCR (qRT-PCR)	54
3.6.5	Normalisierung gegen das <i>h-ALAS Housekeeping-Gen</i>	56
3.6.6	Schmelzkurvenanalyse.....	57
3.6.7	Konventionelle PCR.....	59
3.6.8	Agarosegelelektrophorese.....	60
3.6.9	Sequenzierung	60
3.6.10	MALDI-TOF-MS zur SNP-Analyse.....	61
3.6.11	Microarray-Analysen.....	63
3.7	Arbeitsdiagramm für RNAi-Experimente	64
3.8	Arbeiten mit Proteinen	65
3.8.1	ELISA.....	65
3.8.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	65
3.8.3	Western Blot	66
3.9	Statistik.....	67
<u>4</u>	<u>ERGEBNISSE.....</u>	<u>68</u>
4.1	Infektion von DCs mit HCMV.....	68
4.1.1	Etablierung eines Zellkultursystems zur HCMV-Anzucht.....	68
4.1.2	Kontrolle der Reinheit von Monozyten, DCs und Granulozyten	69
4.1.3	Ermittlung der HCMV Infektionseffizienz bei DCs	71
4.1.4	Zeitabhängige Expressionsanalysen nach Infektion von DCs mit HCMV	72
4.2	TLR-Expression von Monozyten, DCs und Granulozyten	74
4.2.1	Nachweis der Expression von TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 mittels qRT-PCR.....	74
4.2.2	Nachweis der Expression von TLR2, TLR3 und TLR4 mittels Durchflusszytometrie ..	75
4.3	Etablierung eines siRNA Systems für humane DCs	76
4.3.1	Bestimmung der siRNA-Transfektionseffizienz bei DCs	76
4.3.2	Untersuchungen zur Dauer und Stärke des RNAi-Effektes.....	77
4.3.3	Cytokin-Induktion durch RNAi?	79

4.4	Identifikation eines Rezeptors für HCMV auf DCs	80
4.4.1	Transfektion von DCs mit TLR3 siRNA und Stimulation mit poly I:C bzw. LPS.....	80
4.4.2	Nachweis von Phospho-IRF-3 mittels Western Blot	82
4.4.3	Rolle von TLR 3 bei der Erkennung von HCMV	83
4.4.4	Rolle von TLR9 bei humanen DCs	84
4.4.5	Untersuchung der durch HCMV induzierten Immunantwort nach DC-SIGN / TLR2 siRNA Transfektion.....	85
4.5	Zusammenhang zwischen SNPs in <i>Entry</i>-Rezeptorgenen und einem erhöhten Risiko für eine HCMV Reaktivierung / Erkrankung.....	87
4.6	Interaktion von DCs und <i>A. fumigatus</i>.....	94
4.6.1	Untersuchungen zur Phagozytose von <i>A. fumigatus</i> durch DCs	94
4.6.2	Microarray-Analysen nach Infektion von DCs mit <i>A. fumigatus</i> KS (unter immunsuppressiver Wirkung von Mycophenolat)	96
4.6.3	Einfluss von Immunsuppressiva auf die Reifung von DCs	102
4.6.4	Zeitabhängige Co-Kultivierung von DCs mit <i>A. fumigatus</i> KS.....	103
4.7	Identifikation eines Rezeptors für <i>A. fumigatus</i> auf DCs	105
4.7.1	Untersuchung der durch Zymosan vermittelten Immunantwort nach TLR2 siRNA Transfektion.....	105
4.7.2	Untersuchung der durch <i>A. fumigatus</i> vermittelten Immunantwort nach TLR2 siRNA Transfektion.....	106
4.7.3	Untersuchung der durch LPS vermittelten Immunantwort nach TLR4 siRNA Transfektion.....	107
4.7.4	Untersuchung der durch <i>A. fumigatus</i> vermittelten Immunantwort nach TLR4 siRNA Transfektion.....	108
4.7.5	Untersuchung der durch LPS, Zymosan und <i>A. fumigatus</i> vermittelten Immunantwort nach MyD88 siRNA Transfektion.....	110
4.7.6	Untersuchung der durch <i>A. fumigatus</i> vermittelten Immunantwort nach Behandlung mit α -TLR2 bzw. α -TLR4 Antikörpern.....	111
4.7.7	Untersuchung der durch <i>A. fumigatus</i> vermittelten Immunantwort nach PTX-3 und DC- SIGN siRNA Transfektion	112
4.7.8	Untersuchung der durch Zymosan vermittelten Immunantwort nach Dectin-1 siRNA Transfektion.....	113
4.7.9	Rolle von Dectin-1 bei der Erkennung von <i>A. fumigatus</i> und <i>C. albicans</i>	115
4.7.10	Untersuchung der durch <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> und Zymosan vermittelten Immunantwort nach Dectin-1 Blockierung.....	116
4.7.11	Untersuchung der durch <i>A. fumigatus</i> vermittelten Immunantwort nach Card-9 siRNA Transfektion.....	117

4.8	Interaktion von Granulozyten mit <i>A. fumigatus</i>	119
4.8.1	Microarray-Analysen nach Infektion von PMNs mit <i>A. fumigatus</i> KS (unter immunsuppressiver Wirkung von MPA).....	119
4.8.2	Rolle von TLR2, TLR4 und Dectin-1 bei der Induktion des <i>Oxidativen Burst</i>	121
4.8.3	Einfluss von Immunsuppressiva auf den <i>Oxidativen Burst</i> von Granulozyten	123
4.9	Zusammenhang zwischen SNPs im <i>CXCL10</i> Gen und einem erhöhten Risiko für eine IA nach Stammzelltransplantation.....	125
<u>5</u>	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>129</u>
5.1	Generierung und Infektion von DCs mit HCMV	129
5.2	Etablierung einer Methode zur siRNA Transfektion von DCs	130
5.3	Rolle von TLR2, TLR3, TLR9 und DC-SIGN bei der Induktion einer Immunantwort von DCs nach HCMV Infektion	131
5.4	Immunantwort von DCs und Granulozyten nach Kontakt mit <i>A. fumigatus</i> KS.....	133
5.5	<i>A. fumigatus</i> KS als potentielle Aktivatoren von TLR2 und TLR4	135
5.6	Dectin-1 als Rezeptor für <i>A. fumigatus</i> KS auf DCs und Granulozyten	138
5.7	Einfluss von Immunsuppressiva auf DCs und Granulozyten	139
5.8	Genotypisierung von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für eine Infektion durch HCMV oder <i>A. fumigatus</i>	141
<u>6</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>145</u>
<u>7</u>	<u>ANHANG</u>	<u>158</u>
7.1	Abkürzungen	158
7.2	Einheiten.....	159
7.3	Genbezeichnungen.....	160

7.4	Sequenzen.....	161
7.4.1	<i>Card-9</i> DNA-Sequenz (NM_052813).....	161
7.4.2	<i>DC-SIGN (CD209)</i> DNA-Sequenz (NM_021155).....	161
7.4.3	<i>Dectin-1 (CLEC-7A)</i> DNA-Sequenz (NM_197954).....	162
7.4.4	<i>PTX-3</i> DNA-Sequenz (NM_002852).....	162
7.4.5	<i>TLR2</i> DNA-Sequenz (NM_003264).....	163
7.4.6	<i>TLR3</i> DNA-Sequenz (NM_003265).....	163
7.4.7	<i>TLR4</i> DNA-Sequenz (NM_003266).....	163
7.4.8	<i>TLR9</i> DNA-Sequenz (NM_017442).....	164
8	<u>CURRICULUM VITAE.....</u>	165
9	<u>PUBLIKATIONEN UND ABSTRACTS</u>	166

1 Zusammenfassung

1.1 Kurzfassung deutsch

Immunsupprimierte Patienten besitzen ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen, die hauptsächlich durch das humane Cytomegalievirus (HCMV) und den Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* verursacht werden. Ein besseres Verständnis über die Pathogenerkennung und der sich anschließenden Aktivierung des Immunsystems ist von zentraler Bedeutung, um die Ausbreitung von HCMV und *A. fumigatus* im Körper besser kontrollieren zu können.

Aufgrund ihrer Lokalisation in den Geweben unterhalb von Lungenepithelien und des Gastrointestinaltraktes werden dendritische Zellen (DCs) als diejenigen Zellen betrachtet, die während der frühen Phase einer Infektion in Kontakt mit HCMV und *A. fumigatus* kommen und eine Aktivierung von angeborenen und adaptiven Abwehrmechanismen vermitteln. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Bedeutung von humanen DCs bei der Bekämpfung von HCMV und *A. fumigatus* näher untersucht.

Um mit dem klinisch relevanten HCMV Stamm TB40E arbeiten zu können, musste zuerst ein geeignetes Zellkultursystem zur Anzucht von HCMV etabliert werden. Die aus Fibroblasten aufgereinigten Viren eigneten sich zur erfolgreichen Infektion von DCs, was durch verschiedene Färbemethoden nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund war es möglich, in Abhängigkeit der Zeit ein Expressionsprofil von Klasse I Interferonen (*IFN- α* , *IFN- β*), ausgesuchten Cytokinen (*CXCL10*, *CXCL11*, *Rantes*) und den wichtigen Immunrezeptoren *Toll-like Rezeptor 3 (TLR3)* und *dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)* zu erstellen.

Nachdem ein RNA Interferenz (RNAi) System zur erfolgreichen Transfektion von DCs mit *small interfering RNA (siRNA)* etabliert werden konnte, ohne dass dies zu einer unerwünschten Cytokinantwort führte, gelang es die Expression von *TLR3* signifikant herunterzuregulieren. Stimulationsexperimente mit dem synthetisch hergestellten Polymer poly I:C (welches dsRNA von infektiösen Viren ähnelt) identifizierten *TLR3* als den Rezeptor, der die Expression von *IFN- β* vermittelt. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass *TLR9* bei *ex vivo* generierten DCs keine Funktion besitzt. Eine direkte Aktivierung von *TLR3* durch HCMV konnte mittels siRNA nicht nachgewiesen werden.

Durch den Einsatz von genomweiten Microarray-Analysen konnten eine Vielzahl an Genen gefunden werden, die nach Co-Kultivierung von DCs und lebenden *A. fumigatus* Keimschläuchen (KS) differentiell exprimiert waren. Dabei wurde ein breites Spektrum an Cytokinen (*TNF- α* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-12*), Chemokinen (*IL-8*, *CCL20*, *CXCL10*), Co-stimulatorischen Molekülen (*CD40*, *CD80*, *CD83*, *CD86*), Prostaglandin Synthese Genen (*PTGS2*) und Immunrezeptoren (*PTX-3*, *TLR2*, *TLR4*) gefunden, deren zeitabhängiges Expressionsprofil mittels qRT-PCR eindeutig bestätigt wurde. Diese Untersuchungen eröffneten neue Einblicke in die Aktivierung von DCs nach direkter Kontaktaufnahme mit *A. fumigatus*.

Als Wachen des Immunsystems müssen DCs Krankheitserreger zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion erkennen. Die Erkennung von Pilzen wird durch die unterschiedlichen Rezeptoren vermittelt, die TLRs, C-Typ Lektine und Pentraxine umfassen, wobei ihre Bedeutung für humane DCs bisher nur unzureichend geklärt ist. Durch den Einsatz von siRNA konnte die Expression von *TLR2*, *TLR4*, *myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)*, *DC-SIGN*, *Pentraxin-3 (PTX-3)* und *caspase recruitment domain family member 9 (Card-9)* signifikant verringert werden. Für *TLR2*, *TLR4*, *PTX-3* und *DC-SIGN* konnte durch den Einsatz der RNAi aufgezeigt werden, dass diese Rezeptoren nicht an der Induktion einer pro-inflammatorischen Immunantwort von DCs nach Infektion mit *A. fumigatus* beteiligt sind. Sowohl die Stimulierung mit den TLR Liganden Zymosan und LPS, als auch mit *A. fumigatus*, führte zu einer erhöhten Expression von *TNF- α* und *IL-12 (Light Cyclo)*, die sich in einer vermehrten Cytokinfreisetzung (ELISA) bemerkbar machte. Im Gegensatz zur *TLR4* siRNA Transfektion und LPS-Stimulation war keine Reduktion der Expression von *TNF- α* und *IL-12* nach *TLR2* und *TLR4* siRNA Transfektion und anschließender Pilzinfektion zu beobachten. Auch der Einsatz von gegen TLRs gerichteten Antikörpern konnte eine mögliche Signaltransduktion bei DCs nicht unterbinden.

Anstelle von *TLR2* und *TLR4* wurde Dectin-1 als DC-Immunrezeptor für *A. fumigatus* KS identifiziert. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Dectin-1 war es möglich, die Freisetzung von *TNF- α* und *IL-12* nach Pilzinfektion zu blockieren. In einem unabhängigen Experiment mit siRNA wurde Dectin-1 als Rezeptor für *A. fumigatus* bestätigt, der ein Signal zur Expression von pro-inflammatorischen Cytokinen in die Zelle vermittelt. Wie fortführende Experimente mit *Candida albicans* KS und Zymosan gezeigt haben, handelt es sich bei Dectin-1 auf humanen DCs um einen generel-

len Rezeptor für Pilze, dessen Funktion nicht nur auf die Erkennung von *A. fumigatus* KS beschränkt ist.

Durch Untersuchungen zum Einfluss von Immunsuppressiva (Cyclosporin A, Dexamethason, Cortison and Mycophenolat) auf Immuneffektorzellen konnte gezeigt werden, dass Mycophenolat einen Einfluss auf die Sauerstoffradikalbildung von Granulozyten hat. In Übereinstimmung zu bisherigen Literaturangaben zeigte Mycophenolat einen verstärkenden Effekt auf den durch *A. fumigatus* induzierten *Oxidativen Burst*, und bestätigte somit Mycophenolat als möglichen Risikofaktor für eine akute Entzündungsreaktion.

Die durchgeführten SNP-Analysen (*single nucleotide polymorphism*) zur Ermittlung eines Zusammenhanges mit einem erhöhten Virus- und Pilzinfektionsrisiko für Patienten nach Stammzelltransplantation erbrachten die Erkenntnis darüber, dass zwei Marker (rs735240, rs2287886) in *DC-SIGN* mit einer erhöhten Empfänglichkeit für HCMV, und drei Marker (rs1554013, rs3921, rs4257674) in *CXCL10* mit einem vergrößerten Risiko für eine invasive Aspergillose assoziiert waren. Ein *Screening* von Patienten auf das Vorhandensein dieser definierten SNPs könnte helfen, die individuelle Gefahr für HCMV und *A. fumigatus* nach allogener Stammzelltransplantation abzuschätzen. Ein Vergleich verschiedener Genotypisierungsmethoden stellte die Vorzüge des *Light Cyclers* und der *matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry* (MALDI-MS) gegenüber der Sequenzierung bei Verwendung von geringen Mengen an Patienten-DNA heraus.

1.2 Summary

Patients after allogenic stem cell transplantation (alloSCT) have an increased risk to suffer from viral and fungal infections, which are mainly caused by the human cytomegalovirus (HCMV) and the mold *Aspergillus fumigatus*. The understanding of pathogen recognition and subsequent induction of a pro-inflammatory immune response is of primary relevance for understanding the course of infection.

Due to their localization in tissues under lung epithelia and the gastrointestinal tract, dendritic cells (DCs) are considered to be the first cells coming into close contact with HCMV and *A. fumigatus* for the activation of innate and adaptive immune mechanisms. Within the scope of this dissertation, the role of human monocyte-derived DCs in the abatement of HCMV and *A. fumigatus* was analyzed.

In order to work with HCMV, a cell culture system for effective culturing of the clinical relevant HCMV strain TB40E had to be established first. The viral particles up-cleaned from lung fibroblasts were used for infection of DCs and successful infection was approved by different staining methods. For this reason, it was possible to determine a time-dependent expression profile of class I interferons (*IFN- α* , *IFN- β*), selected cytokines (*CXCL10*, *CXCL11*, *Rantes*) and immunoreceptors (*TLR3*, *DC-SIGN*).

A RNA interference (RNAi) system for human DCs was established to significantly knock-down expression of *TLR3* without the induction of an unwanted pro-inflammatory cytokine response. Stimulation experiments with the synthetic polymer poly I:C (which resembles dsRNA of infectious viruses) identified *TLR3* as a receptor for triggering expression of *IFN- β* . However, whether there is a direct activation of *TLR3* through dsRNA intermediates, possibly emerging during replication of HCMV, can not be answered to date definitively, because *TLR3* small interfering RNA (siRNA) transfection prior to HCMV infection did not result in minor expression of *IFN- β* .

Gene expression pattern of DCs after co-cultivation with living *A. fumigatus* germ tubes was studied by whole genome microarray analysis and real-time PCR, demonstrating an upregulation of a broad spectrum of cytokines (*TNF- α* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-12*), chemokines (*IL-8*, *CCL20*, *CXCL10*), co-stimulatory molecules (*CD40*, *CD80*, *CD83*, *CD86*), prostaglandin synthesis genes (*PTGS2*), as well as genes involved in fungal recognition (*PTX-3*, *TLR2*, *TLR4*) and cytoskeleton organization / phagocytosis.

As the sentries of the immune system, DCs must recognize fungi at an early step of infection. Pathogen detection is mediated by different receptors comprising TLRs, C-type lectins and Pentraxines (PTX), but only little is known about their relevance for DCs. Using specific siRNAs, expression of *TLR2*, *TLR4*, *myeloid differentiation primary response gene 88* (*MyD88*), *dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin* (*DC-SIGN*), *Pentraxin-3* (*PTX-3*) and *caspase recruitment domain family member 9* (*Card-9*) was significantly diminished, respectively. In contrast to control experiments with *TLR4* siRNA and LPS stimulation, *A. fumigatus* induced expression of pro-inflammatory cytokines (*TNF- α* , *IL-12*) was not reduced when *TLR2* and *TLR4* expression was knocked-down by specific siRNAs prior to infection. However, using siRNAs directed against Dectin-1 allowed demonstration of an interaction between Dectin-1 and *A. fumigatus* germlings, *Candida albicans* germ tubes and Zymosan. In

an independent approach, cytokine secretion could be blocked by anti-Dectin-1 antibody treatment prior to fungal exposure. In conclusion, Dectin-1 was identified as an important fungal receptor on DCs whereas TLR2 and TLR4 seemed to play a negligible role.

Studies about the influence of immunosuppressive drugs (Cyclosporine A, Dexamethasone, Cortisone and Mycophenolate) on immune effector cell functions revealed that Mycophenolate had an influence on the production of reactive oxygen species (ROS) of human polymorphonuclear neutrophils (PMNs). In agreement to previous literature, Mycophenolate showed positive stimulatory effect on the oxidative burst induced by *A. fumigatus* germ tubes. These observations underlined the hypothesis, that Mycophenolate represents a possible risk factor for the development of an acute inflammatory syndrome by stimulating PMNs for release of ROS.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in various cellular receptor genes are associated with the susceptibility to and severity of infectious diseases. In this study, genetic polymorphisms in genes encoding for virus entry receptors have been analyzed for their association to HCMV reactivation and disease in patients after allogeneic stem cell transplantation. A comparison of different genotyping methods highlighted the advantages of the Light Cycler system, the cycle-sequencing and the matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) when using small quantities of patients' DNA.

Two markers (rs735240, rs2287886) in the promoter region of *DC-SIGN* were found to be significantly associated with an increased susceptibility to HCMV. In addition, three SNPs (rs1554013, rs3921, rs4257674) in *CXCL10* elevated the risk for the development of invasive aspergillosis. Screening of patients after alloSCT for the presence of these defined genetic polymorphisms may help to predict the individual risk to suffer from HCMV and *A. fumigatus* after alloSCT.

2 Einleitung

2.1 Das humane Cytomegalievirus (HCMV)

2.1.1 Taxonomie, Prävalenz und Pathogenese

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) ist entsprechend der Klassifikation des „Internationalen Komitees für Virustaxonomie“ (ICTV) ein Mitglied der Familie der Herpesviridae (www.virustaxonomyonline.com). Die Herpesviren umfassen mehr als 100 beschriebene Viren mit acht humanpathogenen Vertretern. Diese lassen sich aufgrund ihrer Pathogenität, ihres Wirtsspektrums, der Dauer ihres Replikationszyklus, der Cytopathologie und des Zelltropismus in drei Unterfamilien (α -, β - und γ -Herpesviridae) einteilen. HCMV, auch humanes Herpesvirus 5 (HHV-5) genannt, gehört zur Gruppe der β -Herpesviren, die sich durch ein enges Wirtsspektrum und einen langsamen Vermehrungszyklus auszeichnen (Modrow und Falke, 2002).

Der Name der Herpesviren leitet sich vom griechischen Wort *herpein* = kriechen ab, und deutet auf die „kriechende“ Ausbreitung des durch das *Herpes simplex Virus* (HSV) verursachten Hautausschlages hin. Durch HCMV infizierte Fibroblasten zeigen als auffälliges Merkmal eine Abrundung und deutliche Vergrößerung der Zellen, die als Cytomegalie bezeichnet wird. In diesem Fall spricht man auch von einem cytopathischen Effekt (CPE).

Herpesviren kommen nicht nur beim Menschen vor, sondern bei vielen verschiedenen Wirbeltieren. Angefangen von Fischen und Fröschen, bis hin zu Katzen und Affen können durch Herpesvirus-Infektionen betroffen sein. Allen Herpesviren gemeinsam ist, dass es neben der lytischen Vermehrung, in der die Zellen durch das Virus zerstört werden, auch eine Phase der Latenz gibt (Sissons *et al.*, 2002). Dies bedeutet, dass die Viren nach der Primärinfektion in einer Art Ruhezustand in der Wirtszelle verharren, während die Bildung von infektiösen Partikeln unterbleibt. Erst nach einem bestimmten Stimulus (UV-Licht, Stress, etc.) oder bei Schwächung des Immunsystems kommt es zur Bildung von neuen Viren.

HCMV ist in der Lage, eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen zu infizieren (Jarvis und Nelson, 2002). Neben Endothelzellen und Fibroblasten können auch Leukozyten durch das Virus infiziert werden. Letzteres trägt zur hämatogenen Disseminierung des Virus in andere Organe (Leber, Gehirn, etc.) bei.

Der Erreger ist weltweit verbreitet mit einer Prävalenz in Europa von ca. 40 bis 80%. Eine Übertragung des Virus erfolgt durch Schmier- und Tröpfcheninfektionen, kann allerdings auch intrauterin, über die Muttermilch und durch Bluttransfusionen und Organtransplantationen erfolgen. Bei gesunden Personen verläuft eine Primärinfektion normalerweise asymptomatisch und zieht im schlimmsten Fall grippeähnliche Symptome nach sich. Im Gegensatz dazu hat eine Schwächung des Immunsystems, die durch bestimmte Vorerkrankungen, wie z.B. AIDS und Leukämien oder eine Stammzelltransplantation bedingt sein kann, eine Reaktivierung des Virus und somit lebensbedrohliche Komplikationen zur Folge (Hebart und Einsele, 2004).

Bereits in den frühen 80er Jahren wurden Virulenzunterschiede zwischen verschiedenen HCMV-Stämmen beschrieben (Quinnan *et al.*, 1984). Klinische Isolate, wie der Stamm TB40E zeigten einen ausgeprägten Tropismus für Endothelzellen, den in Fibroblasten propagierte Laborstämme nicht mehr besaßen. Ein heute in Laboren weit verbreiteter Stamm ist AD169. Dieser hat seine Cytopathogenität für Endothelzellen durch mehrfaches Passagieren in Fibroblasten verloren.

2.1.2 Genomorganisation und Aufbau des Viruspartikels

HCMV gehört zu den humanpathogenen Viren mit der höchsten Codierungskapazität (Bankier *et al.*, 1991). Das Virus besitzt als Genom lineare doppelsträngige DNA (dsDNA), in einer Größenordnung von 230 kb, wobei ca. 200 Gene codiert werden.

Das Genom besteht aus einem langen (*unique long*, UL) und einem kurzen (*unique small*, US) Segment. Beide Segmente werden durch repetitive Sequenzen voneinander getrennt (*internal repeat short*, IRS und *internal repeat long*, IRL) und an den Enden flankiert (*terminal repeat short* TRS und *terminal repeat long*, TRL). Auf diesen Bezeichnungen basierend werden die viralen Gene mit den Präfixen TR, IR, UL oder US gekennzeichnet und die Leserahmen (ORF) fortlaufend nummeriert. Alternativ sind Strukturproteine mit der Abkürzung VP, für Virionproteine, und einer Nummer versehen. Von diesen sind die Proteine zu unterscheiden, die erst in der Wirtszelle synthetisiert werden (ICP = *infected cell proteins*). Alle Bezeichnungen werden in der Literatur parallel verwendet.

Eine Besonderheit bei der Expression ist die bidirektionale Transkription von Genen (Jacobs und Langland, 1996). Dies bedeutet, dass beide DNA-Stränge als Matrize dienen und Gene in beide Richtungen transkribiert werden.

Die dsDNA befindet sich in einem Capsid mit Ikosaeder-Form, welches selbst von einer Proteinschicht, dem Tegument, umgeben wird (Gibson, 1996). Ein nicht nur für die Initiation der viralen Genexpression wichtiger Bestandteil des Teguments ist das Phosphoprotein 65 (pp65), welches auch zur Diagnostik einer HCMV-Infektion herangezogen wird (Jahn und Plachter, 1993).

Das Capsid und das Tegument sind von einer Membran umschlossen, in die zahlreiche Glykoproteine eingelagert sind (Compton, 2004). Die Glykoproteine, die sich in der Hüllmembran befinden, spielen eine zentrale Rolle bei der Adhäsion des Virus an die Wirtszelle (s. 2.1.3), dienen aber auch als Erkennungsstellen für das Immunsystem (s. 2.4.2). Insgesamt besitzt das Viruspartikel (Virion) eine Größe von ca. 150-200 nm.

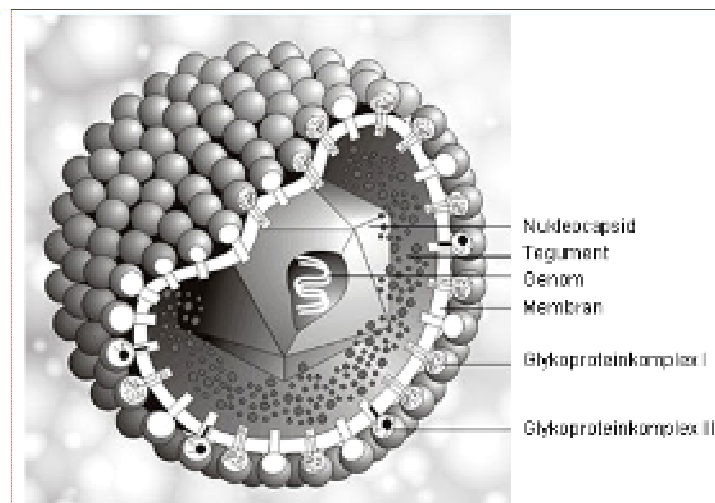


Abbildung 1: Plastische Ansicht der Struktur eines HCMV Virions (Abbildung modifiziert nach Gandhi und Khanna, 2004).

2.1.3 Virus Adhäsion, Penetration und Replikation

Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums von HCMV ist es nicht verwunderlich, dass nicht ein einzelner zellulärer Rezeptor die Anlagerung des Virus an eine Zielzelle vermittelt, sondern inzwischen eine Reihe verschiedener Rezeptoren identifiziert werden konnten (Übersicht in Compton, 2004).

In der Virushülle sind 12 Glykoproteine eingelagert, von denen das zur Adsorption und Penetration wichtigste Glykoprotein B (gB oder auch UL55 genannt) ist. Momentan wird davon ausgegangen, dass die Glykoproteine gM/gN und gB zunächst eine lockere Bindung (*tethering*) mit Heparan-sulfat Proteoglykanen (*Syndecan-Gene*) auf

der Zielzelle eingehen, um dann eine feste Verbindung über gB zum eigentlichen Rezeptor zu ermöglichen (s. Abbildung 2). Wang *et al.* konnten 2003 zeigen, dass die EGFR-like Domäne von gB zur Bindung an den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) dient. Allerdings stellt eine neuere Arbeit von Isaacson, 2007 diese Beobachtungen in Frage, was darauf hindeutet, dass es weitere Rezeptoren gibt, die das Virus-*entry* vermitteln. Bislang konnten folgende Rezeptoren identifiziert werden: Annexin II (Pietropaolo und Compton, 1997), verschiedene Integrine (Feire *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005) und Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN; Halary *et al.*, 2002).

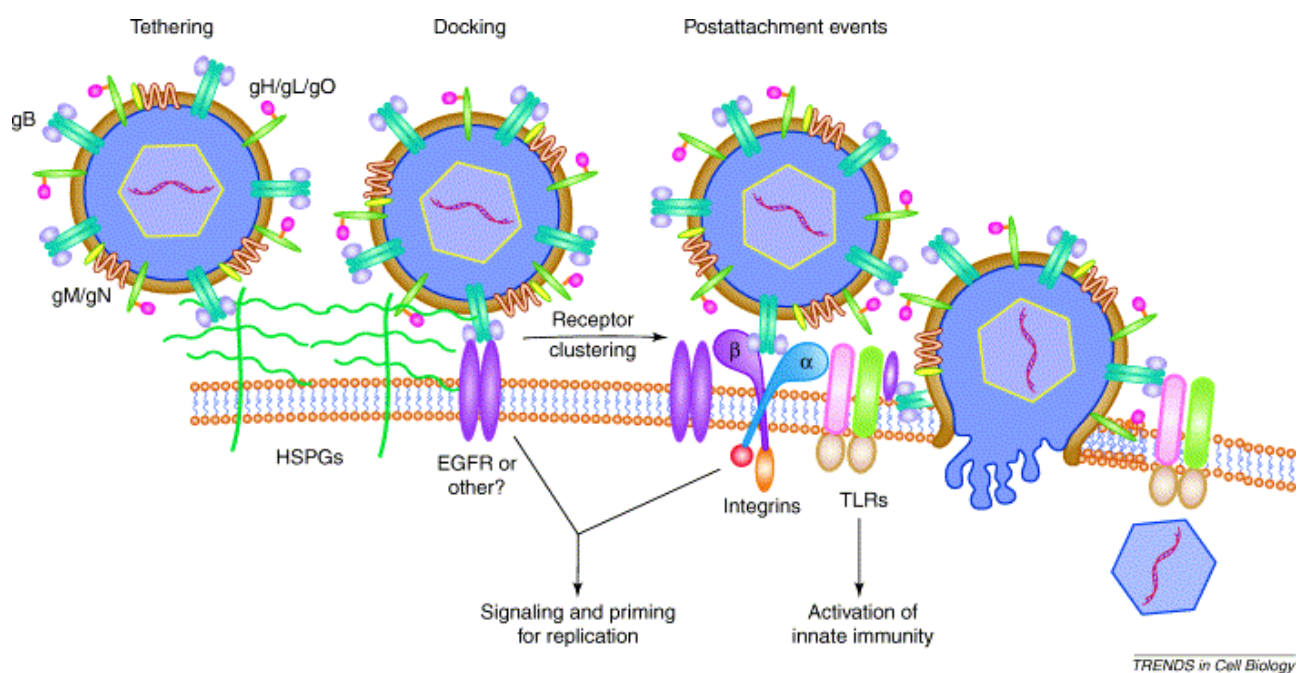


Abbildung 2: Anlagerung von HCMV an eine Wirtszelle (Abbildung entnommen aus Compton, 2004).

Im Anschluss an die Adsorption erfolgt die Fusion der Virusmembran mit der Plasmamembran der Zielzelle und das Nukleokapsid gelangt mit dem Tegument in das Cytoplasma (Penetration). Die eingeschleusten Kapside werden analog zum Herpes Simplex-Virus 1 (HSV1) durch einen Dynein-vermittelten Transport, an den Mikrotubuli entlang, in den Zellkern eingeschleust (Sodeik *et al.*, 1997). Dort angelangt, werden die linearen DNA-Moleküle zirkularisiert und liegen anschließend als so genannte extrachromosomale DNA (Episome) vor.

Die Transkription und Expression der viralen Gene verläuft kaskadenartig und lässt sich auf molekularer Ebene in drei aufeinander folgende Phasen unterteilen (Wathen und Stinski, 1982). Zuerst werden die *immediate early* (IE)- Gene exprimiert, die wie-

derum die Expression nachgeschalteter Gene (*delayed early* Gene) und der späten Gene (VP) zur Folge haben. Nach der produktiven Replikation in permissiven Zellen, die dem Prinzip des *rolling-circle* Mechanismus folgt, werden die neu synthetisierten Genome verpackt (*assembly*) und die Virionen aus der Wirtszelle ausgeschleust.

2.2 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus ist ein Schimmelpilz, der in der Systematik zur Klasse der Ascomyceten (Schlauchpilze), Ordnung der Eurotiales gerechnet wird. Der Name leitet sich von lat. *fumus*, der Rauch ab, und entstammt der rauchgrünen Farbe des Pilzes, die von einem Pigment in den Sporen verursacht wird.

Durch seinen großen Temperaturbereich von 12–56 °C taucht er sowohl im Freien, als auch in Innenräumen auf. So findet man ihn häufig in Biotonnen, im Kompost, in der Blumenerde von Zimmerpflanzen und auf verschimmeltem Brot.

Eine Verbreitung von *A. fumigatus* erfolgt vor allem durch asexuell gebildete Sporen, die als Konidien bezeichnet werden und einen Durchmesser von ca. 3 µm besitzen (s. Abbildung 3). Nach ihrer Auskeimung wandeln sie sich in Keimschläuche um, die weiter zu Hyphen bzw. zu einem Mycel (Hyphengeflecht) heranwachsen. Während der Reifung von Konidien zu Keimschläuchen kommt es zu einem Verlust der hydrophoben Konidienhülle und zu einer kompletten Neugestaltung der Zellwand, die vorwiegend aus Chitin, $\beta(1,3)$ -Glucan und Galactomannan besteht (Fontaine *et al.*, 2000). Eine detaillierte Beschreibung über *A. fumigatus* findet sich in Latgé, 1999.

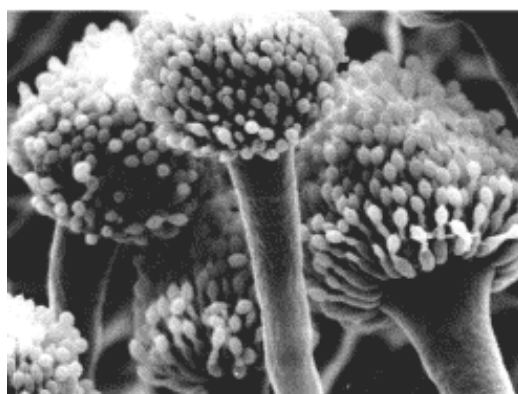


Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahme von *A. fumigatus* Konidien, die in so genannten Ascis (Einzahl: Ascus) organisiert sind (Abbildung entnommen aus Latgé, 2001).

Nur sehr wenige Pilze sind für den Menschen pathogen. Von den bisher 150.000 benannten Pilzarten (die Gesamtzahl wird auf ca. 1,2 Millionen geschätzt) sind bislang nur ca. 150-250 humanpathogene Arten bekannt, darunter Pilze der Gattung *Candida*, *Cryptococcus* und *Aspergillus* (<http://www.wikipedia.org>). Pilzerkrankungen gelten in den USA als die siebthäufigste Todesursache, die auf eine Infektion zurückzuführen sind (Mc Neil *et al.*, 2001).

Die durch *Aspergillus*-Arten hervorgerufenen Krankheiten werden zusammengefasst als Aspergillosen bezeichnet. Tagtäglich atmet jeder Mensch mehrere hundert Konidien ein, weshalb man bei dieser Art der Übertragung von einer exogenen Infektion spricht. Bei Personen mit intaktem Immunsystem bleibt die Inhalation von Sporen normalerweise ohne Folgen, kann aber bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem schwere Krankheiten hervorrufen. So kann es zu Entzündungen der Atemwege, oder in seiner schweren Form zu einer bronchopulmonalen Aspergillose kommen. Dabei muss eine Aspergillose nicht auf das primär befallene Organ beschränkt bleiben, da der Pilz nach Durchdringen von Schleimhautepithelien in andere Organe verbreitet werden kann (Latgé, 2001). In diesen Fällen spricht man von einer (disseminierten) invasiven Aspergillose (IA; Ascioğlu *et al.*, 2002).

Invasive Infektionen mit dem humanpathogenen Pilz *A. fumigatus* zeigen seit einigen Jahren eine zunehmende Inzidenz. Der Grund dafür ist, die stetige Zunahme von stammzelltransplantierten Patienten mit verlängerter Chemotherapie oder weiteren Risikofaktoren, wie ein fortgeschrittenes Alter. Eine Aspergillose tritt bei diesem Patientenkollektiv mit einer Häufigkeit zwischen 5% und 15% auf und endet, falls sie nicht rechtzeitig behandelt wird, fast immer tödlich (Herbrecht *et al.*, 2005). Zur Behandlung einer Pilzinfektion werden verschiedene Medikamente eingesetzt, deren Wirkung in den meisten Fällen darauf beruht, die Zellwandsynthese zu hemmen (Douglas, 2006).

Um invasive Pilzinfektionen und auch Infektionen mit HCMV erfolgreicher therapieren zu können, ist ein besseres Verständnis derjenigen immunologischen Vorgänge, die Pilz- und Virusinfektion kontrollieren, absolut notwendig (Einsele und Hebart, 2002).

2.3 Das angeborene Immunsystem

Alle Lebewesen sind Tag für Tag vielen verschiedenen Erregern (Bakterien, Pilzen, Viren) ausgesetzt, die vom Immunsystem effektiv beseitigt werden müssen. Grundsätzlich wird zwischen der angeborenen und der erst im Laufe einer Infektion erworbenen (adaptiven) Immunität unterschieden. Im Gegensatz zur adaptiven Immunität steht die angeborene Immunität bereits während dem Eindringen eines Erregers zur Verfügung und stellt somit die initiale Verteidigung dar.

Das angeborene Immunsystem beinhaltet physiologische Barrieren (Epithelien, Schleimhäute, Luftstrom in den Lungen, Darmperistaltik), chemische Abwehrstoffe (Defensine, Lysozyme, Pepsin, saurer pH-Wert im Magen, Komplementsystem) und die zelluläre Abwehr, die von verschiedenen weißen Blutkörperchen (Leukozyten) wahrgenommen wird (Tosi, 2005). Zu den Leukozyten gehören neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, sowie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (s. 2.6) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Sie sind entweder selbst in der Lage, einen Erreger zu vernichten oder durch die Produktion von Immunmodulatoren (Cytokinen) die Immunreaktion des Organismus zu steuern und andere Abwehrzellen zum Ort der Entzündung zu locken.

Bei den Cytokinen handelt es sich um kleine lösliche Peptide, die in die Umgebung sezerniert werden und autokrin (auf sich selbst), parakrin (auf Nachbarzellen) und / oder endokrin (über das Blutgefäßsystem verbreitet) wirken. Zu den Cytokinen werden die Chemokine, Interleukine (IL) und Interferone (IFN) gerechnet. Grundsätzlich wird zwischen Cytokinen mit pro-inflammatorischer (TNF- α , IL-12) und anti-inflammatorischer Wirkung (IL-10) unterschieden. Erstere dienen vor allem dazu, weitere Immuneffektorzellen zu aktivieren, um diese an den Ort der Entzündung zu locken.

Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) können Pathogene aufnehmen (Phagozytose) und verdauen. Des Weiteren sind Granulozyten in der Lage, Sauerstoffradikale zu bilden. Dieser Vorgang wird auch als *Oxidativer Burst* bezeichnet und erlaubt das effiziente Abtöten von eingedrungenen Erregern (Quinn und Gauss, 2004). Gerade bei der Abwehr von Pilzen sind Granulozyten von außerordentlicher Bedeutung, was am Beispiel von Patienten mit einer cytoablativen Chemotherapie deutlich wird (Fradin *et al.*, 2005). Aufgrund der reduzierten Granulozytenzahl (Neutropenie) kommt es zum vermehrten Auftreten von Aspergillosen.

Daneben führt auch eine Unterdrückung der Fress- und Abtötungsfunktionen der Granulozyten, wie es zum Beispiel bei einer Cortisontherapie der Fall ist, zu einem erhöhten Risiko für Pilzinfektionen.

Das angeborene Immunsystem kann Infektionserreger erkennen und bekämpfen, ohne dass der Organismus vorher mit dem Erreger Kontakt gehabt hat. Dabei werden Mustererkennungs- und Verteidigungsstrategien angewendet, die sich schon zur Zeit der ersten Eukaryonten als effizient erwiesen haben (Ausubel, 2005). Pathogene können dabei aufgrund konservierter Molekülstrukturen mit Hilfe von keimbahnco-dierten Immunrezeptoren erkannt werden (Błach-Olszewska, 2005). Zu diesen Rezeptoren zählen der Mannose-Rezeptor, die Scavenger-, Komplement- und Toll-like Rezeptoren, sowie die C-Typ-Lektine und Pentraxine. In den nächsten Abschnitten wird die wichtige Familie der Toll-like Rezeptoren und der C-Typ-Lektine näher vorgestellt.

2.4 Toll-like Rezeptoren

2.4.1 Historisches

Im Jahr 1985 wurde erstmals ein Gen beschrieben, welches bei der Ausbildung der dorsoventralen Achse des sich entwickelnden Embryos der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* eine zentrale Rolle einnimmt (Anderson *et al.*, 1985). Aufgrund der Einzigartigkeit dieser Entdeckung, die vergleichbar mit der Entdeckung der Immunglobuline (Ig) und der T-Zell-Rezeptoren (TCR) ist, wurde dem Gen der Name *toll* gegeben. Etwa 10 Jahre später zeigte sich, dass *toll* nicht nur für die frühe Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* wichtig ist, sondern auch um eine Immunantwort gegen Infektionserreger, wie Bakterien und Pilze auszulösen (Lemaitre *et al.*, 1996).

Bezeichnend für den Toll-Signalweg ist, dass dieser große Ähnlichkeit mit dem IL1-Signalweg in Säugern besitzt (Imler und Hoffmann, 2000). So dauerte es nicht lange, bis das erste *toll*-Homolog im Säuger identifiziert wurde (Medzhitov *et al.*, 1997). Bis heute wurden 10 Homologe entdeckt (Rock *et al.*, 1998), die als Toll-like Rezeptoren (TLR) bezeichnet werden (Übersicht in Akira und Takeda, 2004). Heutzutage ist unumstritten, dass den TLRs eine zentrale Funktion bei der Induktion von Immunantworten zukommt (Aderem und Ulevitch, 2000).

2.4.2 Ligandenspektrum der TLRs

Dass TLRs eine zentrale Rolle bei der Erkennung verschiedenster Pathogene einnehmen, zeigt ein Blick auf das Ligandenspektrum, durch welche sie aktiviert werden (s. Tabelle 1). Hierbei fällt auf, dass es sich bei den Liganden um chemisch sehr verschiedene Moleküle handelt, die von Lipiden (Lipopolysaccharid, LPS), über Proteine (Flagellin), bis hin zu Nukleinsäuren (RNA und DNA) reichen.

Rezeptor	Genetischer Locus	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR1	4p14	Lipopeptide	Bakterien
TLR2	4q31-32	Peptidoglykan Zyosan gB	grampositive Bakterien Pilze HCMV
TLR3	4q35	dsRNA poly I:C	Viren synthetisch
TLR4	9q32-33	LPS	gramnegative Bakterien
TLR5	1q41-42	Flagellin	Bakterien
TLR6	4p14	Lipoteichonsäuren Zyosan	grampositive Bakterien Pilze
TLR7	Xp22	ssRNA	Viren
TLR8	Xp22	ssRNA	Viren
TLR9	3p21	CpG DNA	Bakterien / Viren
TLR10	4p14	nicht bekannt	

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten humanen TLRs unter Angabe des jeweiligen genetischen Locus (NCBI) und der wichtigsten Liganden, die von ihnen erkannt werden. Ausführliche Informationen zum Ligandenspektrum finden sich in Akira und Takeda, 2004, wo auch entsprechende Referenzen zu den einzelnen TLR-Liganden nachgeschlagen werden können.

Allen TLRs ist gemeinsam, dass sie konservierte Moleküle erkennen, die als so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, *PAMPs*) bezeichnet werden. Somit gehören die TLRs zur Klasse der Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, *PRRs*). Es gibt zahlreiche Hinweise, dass TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 darauf spezialisiert sind, Zellwandbestandteile von Bakterien und Pilzen zu erkennen. So konnte mehrfach gezeigt werden, dass TLR4 durch LPS aktiviert wird, welches eine zentrale Komponente der Zellwand von gramnegativen Bakterien darstellt (Poltorak *et al.*, 1998; Ulevitch und Tobias, 1999). Dabei bindet LPS an das LPS-bindende-Protein (LBP) und anschließend an CD14 und MD-2 (Wright *et al.*, 1990; Shimazu *et al.*, 1999). Der ge-

samte Komplex interagiert dann mit TLR4 und vermittelt die Signaltransduktion (Jiang *et al.*, 2000; Miyake, 2006), die im nächsten Abschnitt (s. 2.4.3) ausführlich beschrieben ist.

Was die Erkennung von Pilzen durch TLRs betrifft, so konnte bislang eine Beteiligung von TLR2 und TLR4 bei der Erkennung von *A. fumigatus* nachgewiesen werden. Hierbei beziehen sich die meisten Angaben auf Untersuchungen in Zellkultur und auf Experimente mit TLR *knockout*-Mäusen. So konnten Meier *et al.*, 2003 zeigen, dass sowohl TLR2^{-/-}, als auch TLR4^{-/-} Mäuse eine verringerte TNF-α Produktion nach Stimulierung mit *A. fumigatus* Konidien und Hyphen aufwiesen. Von Mambula *et al.*, 2002 konnten diese Beobachtungen nur für TLR2, nicht aber TLR4, bestätigt werden.

Bisherige Arbeiten mit humanen Zellen deuten darauf hin, dass *A. fumigatus* Hyphen Monozyten ebenfalls über TLR2 und TLR4 aktivieren (Wang *et al.*, 2001). Auch Netea *et al.* konnten für *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs, s. 3.5.1) zeigen, dass TLR2 durch Hyphen aktiviert werden. Folgende Tabelle soll einen Überblick über einige der zentralen Experimente zur Entschlüsselung einer Interaktion zwischen TLR2, TLR4 und *A. fumigatus* geben.

Rolle von TLR2 und TLR4 bei der Erkennung von <i>A. fumigatus</i>			
Versuch	Stimulus	Effekt	Referenz
humane Monozyten behandelt mit blockierendem α-TLR2 Ak	EtOH-inakt. Hyphen	TNF-α ↓ (schwach)	Wang <i>et al.</i> , 2001
humane Monozyten behandelt mit blockierendem α-TLR4 Ak	EtOH-inakt. Hyphen	TNF-α ↓	
murine Makrophagen von TLR2 ^{-/-} Maus	Hitze-inakt. Hyphen	TNF-α ↓	Mambula <i>et al.</i> , 2002
	lebende Konidien	TNF-α ↓	
murine Makrophagen von MyD88 ^{-/-} Maus	Hitze-inakt. Hyphen	TNF-α ↓	
	lebende Konidien	TNF-α ↓	
murine Makrophagen von TLR4 ^{-/-} Maus	Hitze-inakt. Hyphen	TNF-α +/-	
	lebende Konidien	TNF-α +/-	
HEK293-Zellen: GOF für TLR2	Hitze-inakt. Hyphen	NFκB-luc-Reporter ↑	
	lebende Konidien	NFκB-luc-Reporter ↑	
HEK293-Zellen: GOF für TLR4	Hitze-inakt. Hyphen	NFκB-luc-Reporter +/-	
	lebende Konidien	NFκB-luc-Reporter +/-	
murine Makrophagen von TLR2 ^{-/-} Maus: Konidien Bindeaffinität	lebende Konidien	nicht beeinflusst	

murine Makrophagen von TLR2 ^{-/-} Maus: NFκB-Translokation in Nukleus	EtOH-inakt. Konidien	Translokation ↓	Meier <i>et al.</i> , 2003
murine Makrophagen von TLR4 ^{-/-} Maus: NFκB-Translokation in Nukleus	EtOH-inakt. Konidien	Translokation ↓	
HEK293-Zellen: GOF für TLR2	EtOH-inakt. Hyphen	NFκB-luc-Reporter ↑	
	EtOH-inakt. Konidien	NFκB-luc-Reporter ↑	
HEK293-Zellen: GOF für TLR4	EtOH-inakt. Hyphen	NFκB-luc-Reporter ↑	
	EtOH-inakt. Konidien	NFκB-luc-Reporter ↑	
murine Makrophagen von TLR2 ^{-/-} Maus	EtOH-inakt. Hyphen	TNF-α ↓ (schwach), MIP-2 ↓	
	EtOH-inakt. Konidien	TNF-α ↓ (schwach)	
murine Makrophagen von TLR4 ^{-/-} Maus	EtOH-inakt. Hyphen	TNF-α ↓	
	EtOH-inakt. Konidien	TNF-α ↓, MIP-2 ↓	
murine Makrophagen von TLR2 ^{-/-} TLR4 ^{-/-} Maus	EtOH-inakt. Hyphen	TNF-α ↓ (total), MIP-2 ↓	
	EtOH-inakt. Konidien	TNF-α ↓ (total)	
TLR4 ^{-/-} Maus	EtOH-inakt. Hyphen	PMN Rekrutierung ↓	
TLR2 ^{-/-} Maus	EtOH-inakt. Hyphen	PMN Rekrutierung ↓	
TLR2 ^{-/-} TLR4 ^{-/-} Maus	EtOH-inakt. Hyphen	PMN Rekrutierung ↓	
humane PBMCs behandelt mit blockie- rendem α-TLR2 Ak	Hitze-inakt. Hyphen	TNF-α ↓	Netea <i>et al.</i> , 2003
	Hitze-inakt. Konidien	TNF-α ↓	
humane PBMCs behandelt mit blockie- rendem α-TLR4 Ak	Hitze-inakt. Hyphen	TNF-α +/-	
	Hitze-inakt. Konidien	TNF-α +/-	
murine Makrophagen von TLR2 ^{-/-} Maus	Hitze-inakt. Hyphen	TNF-α ↓ IL-10 ↓	
	Hitze-inakt. Konidien	TNF-α ↓, IL-10 +/-	
murine Makrophagen von TLR4 ^{-/-} Maus	Hitze-inakt. Hyphen	TNF-α +/-, IL-10 +/-	
	Hitze-inakt. Konidien	TNF-α ↓	
BMDCs von TLR2 ^{-/-} Maus	Zellextrakt	IL-12 ↓	Braedel <i>et al.</i> , 2004
	Überstand	IL-12 +/-	
BMDCs von TLR4 ^{-/-} Maus	Zellextrakt	IL-12 +/-, IL-6 +/-	
	Überstand	IL-12 +/-, IL-6 ↓	
BMDCs von TLR2 ^{-/-} TLR4 ^{-/-} Maus	Zellextrakt	IL-12 ↓, IL-6 +/-	
	Überstand	IL-12 ↓, IL-6 ↓	
	lebende Konidien	TNF-α +/-, IL-12 +/-	

Tabelle 2: Überblick über die bisherige Literatur bezüglich einer Interaktion von TLR2 und TLR4 mit *A. fumigatus*. Es ist jeweils in vereinfachter Form dargestellt, mit welchem Versuchsansatz eine mögliche Interaktion aufgeklärt wurde, und welche Effekte mit welchen Stimuli beobachtet wurden. Zur Vereinfachung der Tabelle wurden folgende Symbole verwendet: +/- bedeutete eine mehr oder weniger unveränderte Expression, ↑ eine höhere Expression und ↓ eine reduzierte Expression des jeweiligen angegebenen Gens. Die Expressionen wurden in der Regel mittels ELISA ermittelt. Weitere Abkürzungen: α (anti), Ak (Antikörper), EtOH (Ethanol), luc (Luciferase), GOF (*gain of function*), HEK293 (humane embryonale Nierenzell-Linie), BMDCs (*bone marrow-derived DCs*), PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*), PMN (*polymorphonuclear neutrophil*).

Im Zusammenhang mit einer Infektion durch HCMV wurde TLR2 als Rezeptor auf Fibroblasten identifiziert (Boehme *et al.*, 2006). Noch bevor HCMV in die Zelle gelangt, kann das Virus über TLR2 und CD14 erkannt werden (Compton *et al.*, 2003). Dass neben TLR2 noch weitere TLRs an der Erkennung von HCMV beteiligt sein

könnten, zeigen Hinweise aus dem Mausmodell. Unlängst wurde in der Maus TLR3 und TLR9 als Rezeptoren für das murine Cytomegalievirus (MCMV) bestätigt, die die Expression von Klasse I Interferonen vermitteln (Tabeta *et al.*, 2004). Gleichzeitig gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass noch weitere TLRs (TLR7) an einer durch MCMV induzierten Immunantwort beteiligt sein könnten (Tabeta *et al.*, 2006). Eine Übersicht zur Interaktion von Viren und TLRs findet sich in Boehme und Compton, 2004 und in Mogensen und Paludan, 2005.

2.4.3 Signaltransduktion

Sobald ein geeigneter Ligand den entsprechenden TLR aktiviert (s. 2.4.2), kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors (Kaisho und Akira, 2006). Dies hat zur Folge, dass sich bestimmte Adapterproteine anlagern können, um eine nachgeschaltete Signalkaskade in Gang zu setzen (Takeda *et al.*, 2003). Bislang konnten im Säuger fünf solche Adapterproteine identifiziert werden, die alle im Besitz einer TIR-Domäne sind, über die die Bindung an die TIR-Domäne der TLR erfolgt: MyD88, TIRAP/Mal, TRIF/TICAM-1, TIRP/TRAM/TICAM-2 und SARM (Übersicht in Vogel *et al.*, 2003). Für den TLR-Signalweg scheint MyD88 das wichtigste Adapterprotein zu sein. Im Gegensatz zu den anderen Adapterproteinen besitzt MyD88 zusätzlich zur TIR-Domäne eine Todesdomäne (DD), die die Interaktion mit weiteren Komponenten vermittelt (Dunne *et al.*, 2003). Die gebundenen Adapterproteine stellen eine Plattform dar, wo sich weitere Proteine, insbesondere Kinasen, anlagern können. So bindet beispielsweise IRAK-4 und erleichtert die IRAK-4 vermittelte Phosphorylierung von IRAK-1 (Li *et al.*, 2002). Die IRAK-Proteine repräsentieren eine Familie mit vier Mitgliedern, denen gemeinsam ist, dass sie am N-Terminus eine Todesdomäne und zentral gelegen eine Serin/Threonin-Kinase Domäne haben (Janssens und Beyaert, 2003). Die Phosphorylierung von IRAK-1 bewirkt, dass sich IRAK-1 selbst phosphoryliert, was die Bindung von TRAF6 ermöglicht (Bradley und Pober, 2001). Anschließend lösen sich IRAK-1 und TRAF6 vom Rezeptor-Komplex ab und interagieren an der Plasmamembran mit einem weiteren vorgeformten Komplex, bestehend aus TAK1, TAB1, TAB2 und TAB3 (Takaesu *et al.*, 2000 und 2003; Ishitani *et al.*, 2003). Dadurch werden TAB2/TAB3 und TAK1 phosphoryliert und translozieren zusammen mit TRAF6 und TAK1 zum Cytoplasma, wo sie den IKK-Komplex, bestehend aus IKK- α , IKK- β und IKK- γ , anregen Phosphatreste auf I κ B zu übertragen (Karin und

Ben-Neriah, 2000). Die Phosphorylierung von I κ B stellt ein Signal zur Ubiquitylierung dar, was zum Abbau von I κ B über das Proteasom-System führt. Dadurch wird NF κ B freigesetzt und gelangt in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor verschiedene Zielgene anschaltet. Zu den Zielgenen zählen vorwiegend proinflammatorische Gene, wie z.B. *TNF- α* und *IL-12*, aber auch anti-inflammatorische Gene, wie *IL-10*.

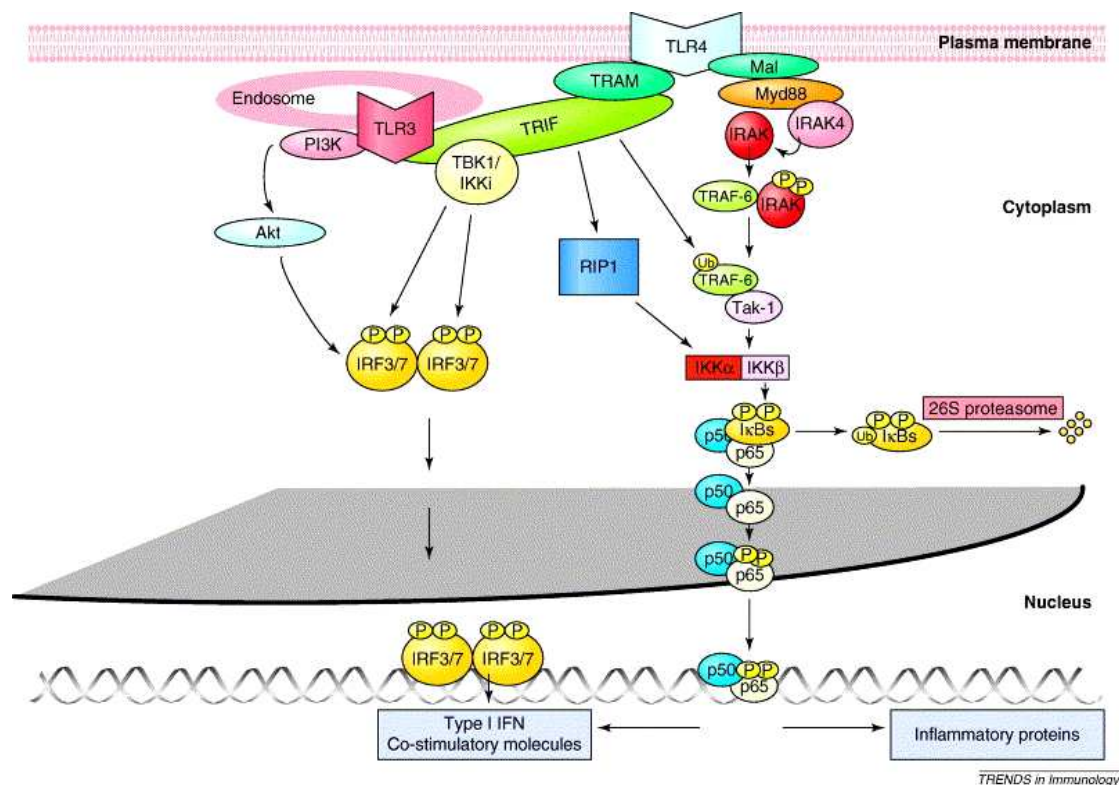


Abbildung 4: TLR2, TLR3 und TLR4 Signaltransduktion (Abbildung entnommen aus Moynagh, 2005).

Wie bereits erwähnt, findet die Signaltransduktion bei allen TLRs über MyD88 statt. Neben dem MyD88-abhängigen Weg gibt es auch einen MyD88-unabhängigen Weg (Kawai *et al.*, 1999), der zusätzlich bei TLR3 und TLR4 vorkommt und durch das Adapterprotein TRIF vermittelt wird (s. Abbildung 4). Über eine Signalkaskade, die bislang nur unzureichend charakterisiert ist, kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und zur Expression von Klasse I Interferonen, *IFN- α* und *IFN- β* (Kawai *et al.*, 2001). Zusätzlich können TLR2 und TLR4 den MyD88-abhängigen Weg über TIRAP aktivieren bzw. TLR4 kann über TRAM den MyD88-unabhängigen/TRIF-abhängigen Weg anschalten. Je nachdem, welcher TLR mit welchem Adapterprotein interagiert, wird ein anderes zelluläres Programm aktiviert (Beutler, 2004). Wie stark

die einzelnen Komponenten des TLR *Pathways* miteinander verknüpft sind, vermittelt ein von Oda und Kitano verfasster Artikel von 2006.

2.4.4 Expression und Lokalisation der TLR

TLR1 kommt auf nahezu allen Zelltypen des menschlichen Organismus vor (Takeuchi *et al.*, 2002), wohingegen die Expression der anderen TLRs sehr stark abhängig vom jeweiligen Zelltyp und von äußeren Bedingungen ist (Hornung *et al.*, 2002). Eine Übersicht darüber, welche Leukozyten welche TLR exprimieren, findet sich in Iwasaki und Medzhitov, 2004. Humane neutrophile Granulozyten exprimieren TLR1 bis TLR10 (Havashi *et al.*, 2003). Obwohl Eosinophile eine konstitutive Expression für TLR1, TLR4, TLR7, TLR9 und TLR10 zeigen, findet eine Aktivierung nur über TLR7 statt (Nagase *et al.*, 2003). Dieses Beispiel macht deutlich, dass es eine gewisse Diskrepanz zwischen dem TLR-Expressionsmuster und der Fähigkeit auf bestimmte TLR-Liganden zu antworten gibt. Für Monozyten wurde gezeigt, dass sie, mit Ausnahme von TLR3, TLR9 und TLR10, alle TLRs besitzen (Iwasaki und Medzhitov, 2004). TLR3 ist bezüglich seines Expressionsprofils ein Sonderfall, da er nur bei dendritischen Zellen (s. 2.6) und Natürlichen Killerzellen (NK) vorzufinden ist (Muzio *et al.*, 2000).

Auch bezüglich ihrer Lokalisation zeigen die TLR Unterschiede: so befinden sich TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 auf der Zelloberfläche, wohingegen TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 vorwiegend in intrazellulären Kompartimenten (Endosomen) vorkommen, weshalb ihnen bei der Erkennung von intrazellulären Erregern (Viren) eine grundlegende Bedeutung zukommt (Matsumoto *et al.*, 2003; Heil *et al.*, 2003; Ahmad-Nejad *et al.*, 2002). Anhand der unterschiedlichen Lokalisation der TLRs wird noch einmal deutlich, dass sich die einzelnen TLR für die Immunabwehr von verschiedenartigen Pathogenen eignen.

2.5 C-Typ Lektine und Pentraxine

Die C-Typ Lektine sind neben der TLR-Familie eine weitere wichtige Familie von keimbahncodierten Immunrezeptoren (Cambi *et al.*, 2005). Sie besitzen als gemeinsames Merkmal eine spezielle Domäne, über die eine Erkennung bestimmter Koh-

lenhydratstrukturen von verschiedenen Pathogenen erfolgt. Daher wird diese Domäne auch als *carbohydrate recognition domain*, kurz CRD, bezeichnet.

Grundsätzlich lassen sich die C-Typ Lektine in sezernierte Proteine und Transmembranrezeptoren, so genannte C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR), einteilen. Zu den löslichen Proteinen gehören unter anderem die Mitglieder der Kollektine, wie z.B. die *Surfactant*-Proteine SP-A und SP-D (Wintergest *et al.*, 1989) und das Mannosebindende Protein (MBP; Kawasaki *et al.*, 1983). Als Beispiele für Transmembranrezeptoren seien die Selektine (Ley und Kansas, 2004), der Mannose-Rezeptor (East und Isacke, 2002) und *dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin* (DC-SIGN) aufgeführt (Geijtenbeek *et al.*, 2000).

Neben einer Funktion bei der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten, besteht eine weitere wichtige Aufgabe von DC-SIGN (CD209) darin, Pathogene zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen (Cambi und Figdor, 2003). Als Adhäsions-Rezeptor vermittelt DC-SIGN die Anlagerung von DCs an ICAM-3 (*intercellular adhesion molecule 3*) von T-Zellen und hat somit eine zentrale Bedeutung bei der Auslösung einer adaptiven Immunantwort (Geijtenbeek *et al.*, 2000). Gleichzeitig wurde DC-SIGN auch als Rezeptor für zahlreiche Pathogene, wie z.B. Bakterien, Viren und Pilzen beschrieben (Halary *et al.*, 2002, Cambi *et al.*, 2003). Serrano-Gomez und Kollegen konnten zeigen, dass Konidien von *A. fumigatus* über DC-SIGN erkannt und internalisiert werden (Serrano-Gomez *et al.*, 2004 / 2005). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für *Candida albicans* Hefen gemacht (Cambi *et al.*, 2005). Somit scheint DC-SIGN vor allem bei der Internalisierung von Pathogenen wichtig zu sein, wohingegen TLRs eher für die Auslösung einer inflammatorischen Cytokinantwort verantwortlich sind (Figdor *et al.*, 2002). Allerdings zeigen neuere Arbeiten, dass es über DC-SIGN zu einer Aktivierung von ERK und PI3K kommt, wodurch die Cytokin Produktion moduliert wird (Caparros *et al.*, 2006).

Ein weiterer Immunrezeptor, der auch zur Familie der C-Typ Lektine gehört, ist Dectin-1 (Brown, 2006; Kanazawa, 2007). Ursprünglich wurde Dectin-1 als ein DC-spezifischer Rezeptor in der Maus entdeckt, der mit einem von T-Zellen exprimierten Ligand interagiert (Ariizumi *et al.*, 2000). Durch das Screenen einer von Makrophagen exprimierten cDNA Bibliothek konnte gezeigt werden, dass Zymosan (eine lysierte Hefepräparation, welche vor allem β -1,3 Glucane enthält) und *C. albicans* an Dectin-1 binden (Brown und Gordon, 2001). Heute gilt als gesichert, dass Dectin-1 ein zentraler Rezeptor für Pilze ist (Dennehy und Brown, 2007; Dostert und Tschopp,

2007). Für Makrophagen konnte nachgewiesen werden, dass Dectin-1 an der Erkennung und Phagozytose von β -1,3 Glucanen und einer damit verbundenen Expression von *TNF- α* beteiligt ist (Brown *et al.*, 2003). Dies scheint durch ein Zusammenwirken (*Crosstalk*) von TLR2, TLR6 und Dectin-1 bewerkstelligt zu werden (Gantner *et al.*, 2003). Ferner wurde für Maus Makrophagen Dectin-1 als Rezeptor für *A. fumigatus* Keimschläuche (Gersuk *et al.*, 2006) und *C. albicans* Hefen identifiziert (Gantner *et al.*, 2005). Dabei zeigen *A. fumigatus* Keimschläuche eine im Vergleich zu Konidien erhöhte und in seiner Struktur veränderten Zymosananteil der Zellwand, weshalb Makrophagen unterschiedlich stark stimuliert werden (Luther *et al.*, 2007). Wie neuere Untersuchungen gezeigt haben, erfolgt die Signaltransduktion über den Dectin-1 Rezeptor mit Hilfe verschiedener Adapterproteine (z.B. *caspase recruitment domain family member 9, Card-9*), über welche die Aktivierung von Nf κ B und die Expression von *TNF- α* vermittelt wird (Gross *et al.*, 2006; Hara *et al.*, 2007;).

Abbildung 5 soll einen Eindruck darüber vermitteln, wie C-Typ Lektine und TLRs an der Erkennung von Pilzbestandteilen beteiligt sind.

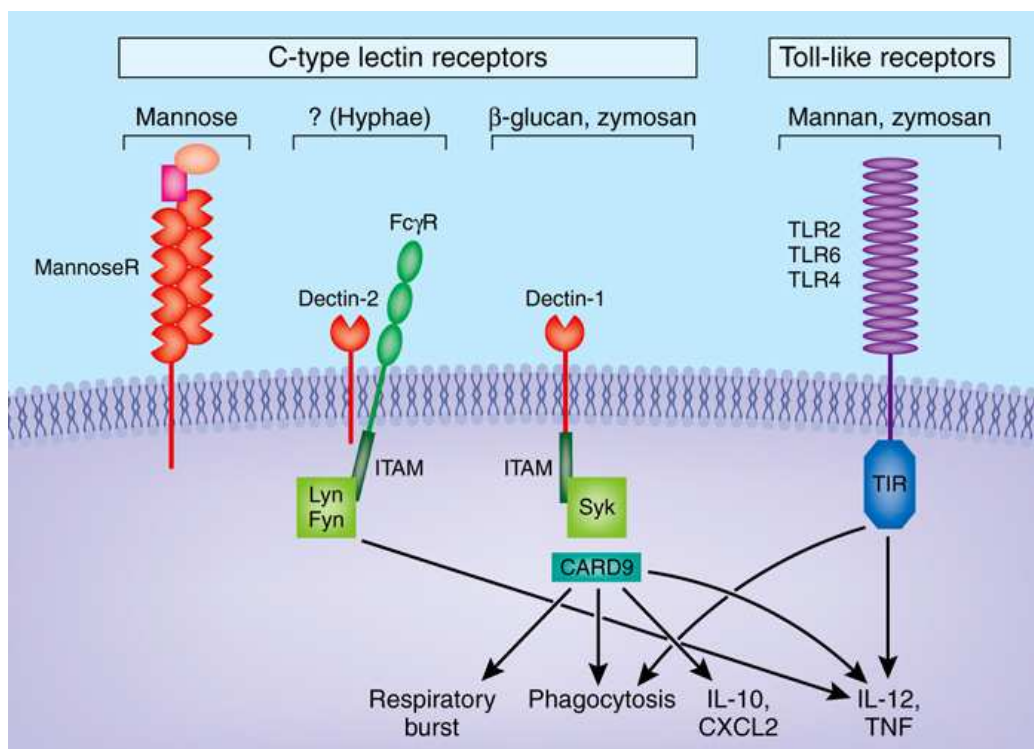


Abbildung 5: Erkennung von Pilzstrukturen durch C-Typ Lektine und TLRs (Abbildung entnommen aus Dostert und Tschopp, 2007). Dectin-1 bindet β -1,3 Glucan und signalisiert über Syk und CARD9, um eine zelluläre Immunantwort auszulösen. Obgleich die Funktionen von Dectin-1, TLR2, TLR4 und TLR6 experimentell gut untersucht sind, ist die Beteiligung des Mannose-Rezeptors weit weniger gut aufgeklärt.

Dectin-1 wird von vielen verschiedenen Immunzellen exprimiert und findet sich auf allen Monozyten-Populationen, sowie auf Makrophagen, DCs, Granulozyten, B-Zellen und bestimmten T-Zell-Subpopulationen (Willment *et al.*, 2005). Sequenzanalysen identifizierten Dectin-1 als einen 28 kDa Typ II Transmembranrezeptor mit einer extrazellulären Domäne (*C-type lectin-like domain* [CTLD]) und einer cytoplasmatischen ITAM-Domäne (*immunoreceptor tyrosine-based activation-like motif*), die die Signaltransduktion vermittelt. Vor kurzem wurde sogar die Röntgenkristallstruktur von Dectin-1 aufgeklärt (Brown *et al.*, 2007).

Neben der großen Familie der TLRs und C-Typ Lektine gibt es noch eine dritte Superfamilie (die Pentraxine), die auch als Immunrezeptoren für Pilze identifiziert wurden (Bottazzi *et al.*, 2006). Als Prototyp der Pentraxine gilt PTX-3, welches von zahlreichen Immuneffektorzellen, darunter DCs, sezerniert wird. Als zentrale Aufgabe dient PTX-3 zur Opsonierung von Pathogenen und einer damit verbundenen Aktivierung des Komplementsystems (Doni *et al.*, 2003). PTX-3 defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber *A. fumigatus* Infektionen, was auf eine verminderte Erkennung und Zerstörung von Konidien zurückzuführen ist (Garlanda *et al.*, 2002). Momentan wird getestet, ob sich rekombinant hergestelltes PTX-3 als therapeutisches Mittel zur Behandlung von IA eignet (Gaziano *et al.*, 2004).

2.6 Dendritische Zellen

Als im Jahre 1868 zum ersten Mal dendritische Zellen (DCs) unter dem Mikroskop beobachtet wurden, wusste man lange Zeit nicht, welche zentrale Rolle sie bei der Vermittlung von Immunantworten spielen. Damals war es gelungen, DCs der Haut, so genannte Langerhans Zellen, sichtbar zu machen. Diese hoben sich durch eine besondere Morphologie von damals bekannten Zelltypen ab. Aufgrund ihrer bäumchenartigen Struktur, die wie Dendriten (griech. *dendrites* = zum Baum gehörend) von Nervenzellen aussahen, wurde ihnen der Name DCs gegeben.

Heutzutage ist bekannt, dass im menschlichen Organismus unterschiedliche Subtypen von DCs vorzufinden sind (Liu, 2001; Hochrein *et al.*, 2002). Diese unterscheiden sich dadurch, dass sie aus unterschiedlichen Vorläuferzellen entstehen und ein charakteristisches Expressionsmuster für bestimmte TLRs aufweisen. Plasmacytoide DCs (pDCs) exprimieren vorzugsweise TLR7 und TLR9, wohingegen myeloide DCs (myDCs) vor allem TLR2 und TLR3 exprimieren (Kadowaki *et al.*, 2001). Folgende

Abbildung zeigt die besondere Morphologie der myeloiden DCs, wie sie auch *in vitro* aus Monozyten durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF generiert werden können.

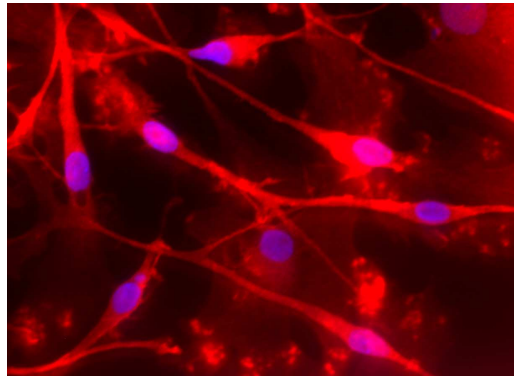


Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme mit 400x Vergrößerung von *in vitro* generierten DCs (s. 3.5.4), dessen Zytoskelett mit Alexa 405 und die Zellkerne mit DAPI angefärbt wurden (s. 3.5.10).

Normalerweise befinden sich DCs vor allem unterhalb von Schleimhautepithelien, wo sie stets damit beschäftigt sind, Antigene durch Phagozytose, Pinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose aufzunehmen (Reis e Soussa *et al.*, 1993; Sallusto *et al.*, 1995). So lange DCs noch nicht durch ein Antigen aktiviert wurden, werden sie als unreife dendritische Zellen (*immature* DCs, iDCs) bezeichnet. Sie exprimieren nur wenig MHC-Moleküle der Klasse I und Klasse II und costimulatorischen Moleküle [CD40, CD80 (B7.1), CD83 und CD86 (B7.2)] auf ihrer Oberfläche, weshalb sie nur in geringem Umfang in der Lage sind, eine adaptive Immunantwort auszulösen (Übersicht in Banchereau und Steinman, 1998). Erst durch den Kontakt mit einem geeigneten Antigen kommt es zur Differenzierung der DCs zu reifen dendritischen Zellen (*mature* DCs, mDCs) und zur Einwanderung in naheliegende sekundär lymphatische Organe (Bozza *et al.*, 2002). Im Zuge dessen werden die Antigene prozessiert und auf MHC-Moleküle der Klasse II geladen (Inaba *et al.*, 2000). Der Komplex aus MHCII und prozessiertem Antigen wird zur Plasmamembran transportiert und an der Zelloberfläche präsentiert. Da DCs die Fähigkeit zur Antigen-Präsentation aufweisen, gehören sie somit zur wichtigen Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen (APC).

Die Reifung von DCs ist ein zentraler Schritt und kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Dazu zählen das Vorhandensein bestimmter Cytokine, wie z.B. TNF- α , oder die Stimulation mit einem Erreger bzw. deren Bestandteilen. Wie unter Abschnitt 2.4 beschrieben, führt eine LPS-Exposition zur Aktivierung von TLR4, und dadurch zur Reifung von DCs (Reis e Sousa, 2004). Dabei kommt es zur erhöhten Expression an Adhäsions-, MHC- und costimulatorischen Molekülen und zur Ein-

wanderung der mDCs in die sekundären lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Milz), wo B- und T-Lymphocyten aktiviert werden. Die Aktivierung setzt in allen Fällen voraus, dass eine B- bzw. T-Zelle einen spezifischen Rezeptor für den Komplex aus MHCII plus Antigen besitzt und gleichzeitig costimulatorische Signale erhält.

Etwa zwei Drittel der IA nach allogener Stammzelltransplantation ereignen sich zu einem Zeitpunkt, an dem der Patient bereits wieder ausreichend neutrophile Granulozyten besitzt, jedoch noch eine verminderte Anzahl an T-Lymphozyten aufweist (Wald *et al.*, 1997). Daraus lässt sich schließen, dass neben den Mechanismen der angeborenen Immunität auch das adaptive Immunsystem bei der Pilzbeseitigung von Bedeutung ist. Untersuchungen zur Rolle von DCs im Zusammenhang mit einer IA haben gezeigt, dass DCs spezifische T-Zellen aktivieren, die zur Verteidigung gegen *A. fumigatus* beitragen können (Hebart *et al.*, 2002; Gafa *et al.*, 2006). Nach der Erkennung von Pilzstrukturen wird diese Information derart decodiert, dass sie in unterschiedlichen T Helfer und in regulatorische T-Zell-Antworten übersetzt wird (Zelante *et al.*, 2006). Dieser Sachverhalt macht nochmals deutlich, dass DCs ein wichtiges Verbindungsglied zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität darstellen (Banchereau *et al.*, 2000; Hoebe *et al.*, 2004). Ein besseres Verständnis darüber, über welche Rezeptoren *A. fumigatus* erkannt und anschließend das adaptive Immunsystem aktiviert wird, ist von entscheidender Bedeutung für neuartige Therapieansätze zur Behandlung invasiver Mykosen.

2.7 RNA-Interferenz

2.7.1 Historisches

Eine der wichtigsten Fortschritte in den letzten Jahrzehnten war die Entdeckung, dass RNA die Expression anderer Gene beeinflussen kann (Übersicht in Mello und Darryl Conte, 2004). Die Arbeit von Guo und Kemphues im Jahre 1995 zielte darauf ab, mit Hilfe einer *antisense* RNA (asRNA), die eine komplementäre Sequenz zu einer zellulären mRNA von *Caenorhabditis elegans* hatte, deren Expression zu blockieren. Allgemeine Verwunderung verursachte die Tatsache, dass auch der Einsatz von *sense* RNA, also RNA, die dieselbe Sequenz wie die Ziel mRNA aufwies, eine Repression der Gen-Expression verursachte.

Später, im Jahr 1998, beobachteten Fire *et al.*, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Fadenwurm *C. elegans* die Expression von Genen 10 bis 100 Mal effektiver herunterregulierte als einzelsträngige RNA (ssRNA). Dieses Ereignis sollte die eigentliche Geburtsstunde der RNA-Interferenz (RNAi) sein, einem konservierten Mechanismus, der, wie sich später zeigen sollte, in vielen Organismen weit verbreitet ist (Maine, 2000). So kommt die RNAi unter anderem in *Drosophila* (Carthew, 2003), *C. elegans*, Pilzen (Catalanotto *et al.*, 2000), Pflanzen (Baulcombe, 2004) und Säugern vor und stellt eine alte, in der Evolution erhalten gebliebene Möglichkeit dar, sich gegen Viren und Transposons zu verteidigen (Hannon, 2002).

Die RNAi hat seit ihrer Entdeckung einen wahren Siegeszug erlebt und ist inzwischen in vielen Labors eine etablierte Methode, wenn es darum geht, Gene systematisch auszuschalten. Am einfachsten geschieht dies durch Transfektion von Zellen mit siRNA, die entweder durch *in vitro* Transkription, einen enzymatischen *Dicer*-Verdau von dsRNA, oder aber idealerweise chemisch synthetisiert wurden (Mocellin und Provenzano, 2004).

Durch die Veröffentlichung der Sequenz des humanen Genoms im Jahre 2001 (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001; *Celera Genomics Project*, 2001) und die Generierung von *small interfering RNA* (siRNA) bzw. *short hairpin RNA* (shRNA) Bibliotheken (Paddison *et al.*, 2004) ist es mittels reverser Genetik möglich geworden, gleichzeitig und gezielt die Funktionen von sehr vielen Genen zu analysieren (Silva *et al.*, 2004).

Aber nicht allein in der Forschung kommt die RNAi zum Einsatz. Die derzeitigen Bemühungen gehen dahin, diese Methode als ein therapeutisches Werkzeug in der Medizin einzusetzen (Caplen, 2004; Scherr *et al.*, 2004). So sollen in der Zukunft Krankheiten wie Krebs (Izquierdo, 2004) und Infektionen mit verschiedenen Erregern (Shlomai, *et al.*, 2004) besser behandelbar werden. Wie wichtig die Entdeckung für ein Verfahren, mit dem sich Gene stummschalten lassen, ist, verdeutlicht die Vergabe des Nobelpreises für Medizin im Jahr 2006 an Andrew Z. Fire und Craig C. Mello (<http://www.nobelpreis.org/>).

2.7.2 Wirkungsmechanismus

Die Wirkungsweise der RNAi basiert auf dem sequenz-spezifischen Abbau einer in der Zelle vorhandenen mRNA (Übersicht in Meister und Tuschl, 2004). Zunächst wird

die dsRNA von zellulären Nukleasen erkannt und zu so genannten siRNAs abgebaut (Novina und Sharp, 2004). Die Enzyme, die diese Reaktion vermitteln, werden Drosha und Dicer genannt und liegen in der Zelle als Dimere vor (Bernstein *et al.*, 2001). Da eines der beiden katalytischen Zentren des Dicer-Enzyms funktionsunfähig ist, wird nicht wie sonst für ein RNase-III-Enzym üblich, alle 9 bis 11 Basenpaare (bp), sondern nur alle 21 bis 25 bp geschnitten (Blaszczyk *et al.*, 2001). Dies führt zur charakteristischen Länge der siRNAs, die zusätzlich noch ein 5'-phosphoryliertes Ende und einen zwei bis drei Nukleotid (Nt) langen Überhang am 3'-Ende besitzen (Elbashir *et al.*, 2001).

Die siRNAs binden an einen Multiprotein-Komplex, namens *RNA induced silencing complex* (RISC): der *sense* Strang wird degradiert und der *antisense* Strang fungiert seinerseits als Gegenstrang-Matrize zur Erkennung einzelsträngiger RNA (Martinez, 2002). Handelt es sich hierbei um komplementäre endogene mRNA, wird sie durch den RISC erkannt und durch dessen Endonukleaseaktivität abgebaut (Martinez und Tuschl, 2004). Letztendlich hat dies zur Konsequenz, dass die entsprechende mRNA nicht mehr translatiert werden kann. Dieser Vorgang wird auch als posttranskriptionelles Gen Silencing (PTGS) bezeichnet und hält zwischen drei und sieben Tagen an.

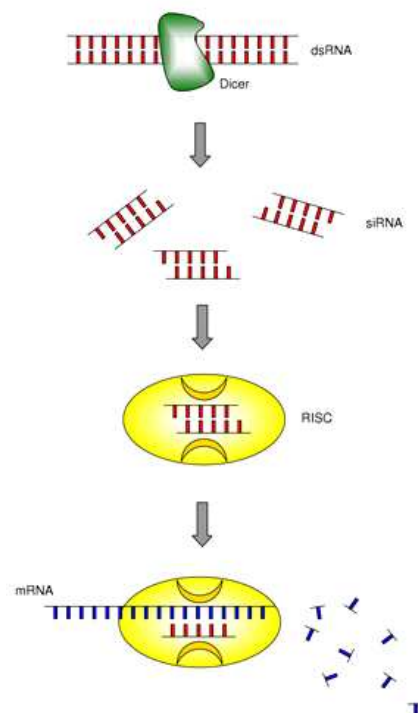


Abbildung 7: Schematische Darstellung der RNAi (verändert nach Mocellin und Provencano, 2004). Durch Transfektion werden siRNAs in die Zelle eingebracht, wodurch die komplementäre mRNA mit Hilfe des RISC degradiert wird.

2.8 Immunsuppressiva

Immunsuppressiva (IS) sind Medikamente zur Unterdrückung bestimmter Funktionen des Immunsystems. Insbesondere bei Patienten, bei denen eine Abstoßungsreaktion nach Organ- oder Stammzelltransplantation vermieden werden muss, kommen Immunsuppressiva zum Einsatz. Zu den gängigsten Immunsuppressiva zählen Cyclosporin A (Sandimmun), Dexamethason (Fortecortin), Solu-Decortin, Mycophenolat (CellCept) und Everolimus (RAD).

Obgleich sich Immunsuppressiva bezüglich ihrer chemischen Struktur und ihrer genauen Wirkungsweise unterscheiden, ist allen gemeinsam, dass sie die Proliferation von T-Zellen nach Stimulierung durch eine antigenpräsentierende Zelle hemmen. Abe und Thomson, 2003 geben einen detaillierten Überblick über die bisher bekannten Wirkungen von Immunsuppressiva. Insbesondere der Aspekt eines Einflusses auf DCs wird berücksichtigt.

Cyclosporin A unterdrückt die Signaltransduktion über den T-Zell-Rezeptor (TCR) und führt dadurch zu einer reduzierten Expression von IL-2 und IL-4 (Liu *et al.*, 1991). Bei fehlendem IL-2 und IL-4 werden T-Lymphozyten nur wenig zur Proliferation angeregt, was sich in einer reversiblen Hemmung der adaptiven Immunantwort bemerkbar macht. Für Maus DCs konnte gezeigt werden, dass Cyclosporin A zu einer Runterregulation von Co-Stimulatorischen Molekülen führt (Lee *et al.*, 1999). Dies hat zur Konsequenz, dass T-Zellen in geringerem Umfang stimuliert werden (Matsue *et al.*, 2002). Bezüglich humaner DCs wurde eine ähnliche Beobachtung gemacht, bei der eine durch TNF- α induzierte Ausreifung durch Cyclosporin A inhibiert wurde (Duperrier *et al.*, 2002).

Auf eine etwas andere Weise wie Cyclosporin A wirkt Mycophenolat (CellCept), deren aktive Form die Mykophenolsäure (*mycophenolic acid*, MPA) ist. MPA hemmt das Enzym Inosin-monophosphat-Dehydrogenase, welches zur Synthese von Purin als Bestandteil von DNA benötigt wird (Sintchak *et al.*, 1996). Ohne diesen Baustein sind Lymphozyten nicht in der Lage zu proliferieren (Allison und Eugui, 2005). Bislang konnte nur für murine DCs nachgewiesen werden, dass Mycophenolat einen negativen Einfluss auf die Reifung hat (Mehling *et al.*, 2000).

Für IS, die zur Klasse der Glucocorticoide gehören (Dexamethason, Solu-Decortin) gibt es zahlreiche Untersuchungen über ihre entzündungshemmenden Eigenschaften. Die meisten Berichte beziehen sich dabei auf T-Zellen und Monozyten / Makrophagen (Abe und Thomson, 2003). Was die Datenlage zum Einfluss auf hu-

mane DCs anbelangt, so konzentrieren sich die Beobachtungen vor allem auf Dexamethason. Piemonti *et al.* fanden 1999 eine starke Beeinflussung der Expression von Co-stimulatorischen Molekülen, wenn DCs unter Dexamethason Gabe generiert wurden. Des Weiteren war die Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren deutlich herabgesetzt (Woltman *et al.*, 2000).

Ein detaillierter Überblick über bislang bekannte Einflüsse von Immunsuppressiva auf die Generierung, Reifung und Cytokinantwort von DCs findet sich in Hackstein und Thomson, 2004.

2.9 Ziele der Arbeit

Eines der Ziele der hier vorliegenden Dissertation war es, ein Zellkultursystem zur Anzucht des klinisch relevanten HCMV Stammes TB40E zu etablieren. Dies umfasste neben der Virusgewinnung und Virustiterbestimmung auch die Etablierung entsprechender Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von mit HCMV infizierten Zellen.

Das aus Fibroblasten gewonnene Virus sollte nach Konzentrierung verwendet werden, um erfolgreich Immuneffektorzellen zu infizieren. Den Schwerpunkt bildeten dabei Infektionen von humanen DCs, die aus Monozyten *in vitro* generiert werden sollten. Ziel dabei war es, ein besseres Verständnis über die Interaktion zwischen dem Virus und seiner Wirtszelle zu bekommen. Mittels RNAi sollte die Expression von Rezeptoren, die im Verdacht standen, bei der Erkennung von HCMV wichtig zu sein (TLR2, TLR3, TLR9, DC-SIGN), herunterreguliert werden. Diese Experimente sollten näher Aufschluss darüber geben, ob eine pro-inflammatorische Antwort nach HCMV Infektion über einen dieser Rezeptoren vermittelt wird. Um die Methode der RNAi auf DCs anzuwenden, war es Voraussetzung, ein geeignetes siRNA Transfektionssystem zu etablieren.

Desweiteren sollte die Frage beantwortet werden, ob es eine genetische Prädisposition für eine erhöhte Empfänglichkeit für HCMV gibt. Hierfür sollte genomische DNA von Patienten nach Stammzelltransplantation genotypisiert werden, um so einen möglichen Zusammenhang zwischen Einzelbasenpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) in Genen, die beim Virus *entry* (s. 2.1.3) eine Rolle spielen, und einem erhöhten Risiko für eine HCMV Reaktivierung bzw. Erkrankung aufzudecken. Analog zu den SNP-Analysen mit HCMV, sollten weitere Untersuchungen klären, ob

ausgesuchte SNPs in immunrelevanten Genen mit dem verstärkten Auftreten einer IA bei stammzelltransplantierten Patienten assoziiert sind.

In Pilz-Infektionsexperimenten sollten *A. fumigatus* Keimschläuche mit DCs oder Granulozyten inkubiert werden. Mit Hilfe von Microarray-Analysen sollte anschließend ermittelt werden, welche Gene nach Kontakt mit *A. fumigatus* differentiell reguliert sind. Daran anknüpfend war es das Ziel, besser zu verstehen, über welche Rezeptoren eine Immunantwort in diesen Zellen ausgelöst wird. Da bislang für humane DCs noch nicht gezeigt wurde, ob TLRs oder andere Immunrezeptoren, wie z.B. DC-SIGN, PTX-3 und Dectin-1 für die Erkennung von Pilzen wichtig sind, sollte durch den Einsatz von siRNA und Rezeptor-spezifischen Antikörpern untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von DCs und Granulozyten unter Einfluss von Immunsuppressiva (Cyclosporin A, Dexamethason, Cortison, Mycophenolat, RAD) näher zu beleuchten. Diese Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob DCs in ihrer Fähigkeit zur Ausreifung, und ob der *Oxidative Burst* von Granulozyten durch Immunsuppressiva beeinflusst wird.

3 Material und Methoden

Der vorliegende Materialteil enthält eine Auflistung über die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Kits, Reagenzien, Lösungen, Medien, Immunsuppressiva, TLR-Liganden, Primer, Sonden, siRNAs und Antikörper.

3.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bioanalyzer	Bioanalyzer 2100	Agilent
Brutschrank	Heraeus BBD 6220	Thermo/Kendro
Cytospin-Einsätze	Zyto-System	Thermo/Kendro
Elektroporationsgerät	EPI 2500	Fischer
ELISA Reader	GENios FL	Tecan
FACS-Gerät	FACS Calibur	Becton Dickinson
Fluoreszenz-Mikroskop		Zeiss
Gefrierschränke	-20°C / -80°C	Liebherr / Heraeus
Gel-Dokumentationssystem	Multiimage Light Cabinet	Biozym
Gel-Kamera	Alpha Innotech	Biozym
Gel-Kammer	Horizon 11.14	Biometra
LightCycler Instrument	Light Cycler 1.5	Roche GmbH
MACS Magnete	Separation Columns LS	Miltenyi Biotec
Magnetrührer	Monotherm	Variomag
MALDI-TOF	Autoflex	Bruker Daltonics
Microarray Chips	HG-U133 Plus 2.0 human genome array	Affymetrix
Microarray Hybridisierungsstation	Fluidics Station 450	Affymetrix
Microarray Scanner	GeneChip Scanner 3000	Affymetrix
Mikroskope	Eclipse 50i und TS100	Nikon
Mikrowelle	MM 41568	Micromaxx
PCR-Gerät	Mastercycler ep	Eppendorf
pH Meter	pH 211	Hanna Instruments
Photometer	Nanodrop ND-1000	Peqlab
Pipetten	Reference (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus-Akku	Hirschmann
Präzisionswaage	GF-200	A & D Instruments
Protein-Elektrophoresekammer	Mini Protean Elektrophorese-System	Biorad
Röntgenfilmentwickler	M35 X-OMAT Processor	Kodak

Schüttler	Duomax 1030	Heidolph
Semi-Dry Blotter	Blue Flash M	Serva
Sequenzierer	ABI 3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems
Spannungsgeräte	Blue Power 500 Standard Power Pack P25	Serva Biometra
SpeedVac	SpeedVac Plus SC110A	Savant
Sterilbank	Herasafe HS18	Thermo/Kendro
Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery 90 SE	Sorvall
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA-Works, Inc.
Wasserbad	Memmert WB7	Memmert
Zentrifugen	Centrifuge 5415D und 5415R Multifuge 3S und 3S-R	Eppendorf Thermo/Kendro

Tabelle 3: Geräteliste.

3.2 Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Labormaterialien

Verbrauchsmaterial	Kennzeichen	Hersteller
<i>Cell Strainer</i>	40 µm Nylon	Becton Dickinson
Einfrierröhrchen	2 ml	Roth
Elektroporationsküvetten	0,4 cm Elektrode	Biorad
FACS-Röhrchen	5 ml, 12 x 75 mm	Becton Dickinson
LightCycler Glaskapillaren		Roche GmbH
MACS-Trennsäulen	LS	Miltenyi Biotec
MT-Platten	6 Well / 24 Well / 96 Well	Becton Dickinson
Objektträger		Hartenstein
Pasteurpipetten	einzel steril verpackt	Hartenstein
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Zentrallager
Reaktionsgefäße	0,2 ml / 1,5 ml / 2 ml Tubes 15 ml / 50 ml Falcontubes	Hartenstein
Röntgenfilme	Super RX, 18x24 cm	Kodak
Serologische Pipetten	1 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml	Hartenstein
Transfermembran	Nitrocellulose	Schleicher & Schuell
UZ Röhrchen	25x89 mm	Beckmann
Whatman Papier	85 x 110 mm	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen	25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Hartenstein

Tabelle 4: Liste über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

3.2.2 Kits

Kit	Hersteller
<i>Agilent RNA 6000 Nano Kit (Bioanalyzer)</i>	Agilent
<i>Big Dye Sequenziermix</i>	Applied Biosystems
<i>GeneChip U133 Plus 2.0 Set</i>	Affymetrix
<i>Genostrep 96 Kit (Primer Extension)</i>	Bruker
<i>Human IL-12+p40, TNF-α Cyto Set (ELISA)</i>	Biosource
<i>Light Cycler FastStart DNA Master Hybridization Probes</i>	Roche GmbH
<i>Light Cycler Primer Set Human Interferon-α und Human Interferon-β</i>	Search LC
<i>LightCycler h-ALAS Housekeeping Gene Set</i>	Roche GmbH
<i>PCR Kit</i>	Peqlab
<i>One-Cycle / Two-Cycle Labeling Kit</i>	Affymetrix
<i>QIAshredder</i>	Qiagen
<i>Qproteome Mammalian Protein Preparation Kit</i>	Qiagen
<i>Quantitect Reverse Transcription Kit</i>	Qiagen
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen

Tabelle 5: Auflistung der eingesetzten Kits.

3.2.3 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Aceton	Sigma
ACK Lysepuffer	Cambrex
Agarose	Roth
Alexa Phalloidin	Sigma
Alkalische Shrimp Phosphatase (SAP)	USB Corporation
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
BCIP/NBT Tabletten (AP-Substrat)	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Blocking Reagenz (BSA)	Boehringer
Coomassie	Invitrogen / Biorad
DAPI	Sigma
Dichlorfluorescein	Sigma
DMSO 99,5%	Sigma
DNA-Leiter (100 bp)	Invitrogen
ECL Western Blotting	Amersham Bioscience
EDTA	Sigma
Elektrophoresepuffer für SDS-Page (10x)	Roth

Material und Methoden

Essigsäure	Roth
Ethanol 100%	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Evans Blue	Viva Diagnostika
Exonuclease I (Exol)	BioLabs GmbH
FACS Flow / Rinse / Safe	Becton Dickinson
FCS	Sigma
FICOLL	Biochrom AG
FITC	Sigma
Fluokeep Eindeckmedium	Viva Diagnostika
Formaldehyd 37%	Polysciences Inc.
Formaldehyd 4%, neutral gepuffert	Sigma
Formamid	Sigma
Gel Ladepuffer (<i>blue juice</i>)	Invitrogen
Gelstar	Biozym Diagnostik GmbH
Gentamycinsulfat (Refobacin® 80 mg)	Merck
Glutamin (200mM)	Cambrex
Glycerin	Roth
HBSS Hanks' Balanced Salt (1x)	GIBCO, Invitrogen Corp.
LPS (ultrarein)	Sigma (Invivogen)
MEM Medium	Cambrex
Methanol	J.T Baker
Natriumacetat	Roth
Natronlauge 2N	Roth
NEAA (100x)	Cambrex
Paraformaldehyd	Roth
PBS (10x)	Sigma
PMA	Sigma
Polyacrylamid	Roth / Biorad
Polymorphprep 1,077 g/ml	Progen Biotechnik GmbH
Ponceau	Sigma
Protein Ladepuffer	Serva
Proteinmarker	Peqlab
Refobacin	Merck
RPMI 1640 Medium (+ Glutamaxx)	GIBCO, Invitrogen Corp.
Salzsäure 2N	Roth
SDS	Roth
TAE-Puffer (10x)	Invitrogen
TBS 10x	Biorad
TEMED	Roth

TNF- α	R&D Systems
TRIS-hydrochlorid	Roth
Triton X 100	Sigma
Trypanblau 0,4 %	Sigma
Trypsinlösung	Cambrex
Tween 20	Sigma

Tabelle 6: Reagenzienliste. Eine Liste der verwendeten Abkürzungen findet sich unter Abschnitt 7.1.

3.2.4 Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Einzelkomponenten
Assay Puffer für ELISA (TNF-α und IL-12) (Die Einzelkomponenten wurden aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie des Universitätsklinikums Würzburg bezogen.)	8,0 g NaCl 1,42 g Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g KCl 5,0 g BSA 1 ml Tween 20 Auffüllen auf 1 l mit H ₂ O, pH 7.4
ATV (Die Einzelkomponenten wurden aus dem Institut für Virologie des Universitätsklinikums Würzburg bezogen.)	0,4 g KCl (Merck) 8 g NaCl (Merck) 0,5 g Trypsin 250 0,2 g EDTA 1 g D-Glucose (Merck) 0,58 g NaHCO ₃ (Merck) Auffüllen mit H ₂ O auf 1 Liter
Coating Puffer für ELISA (TNF-α und IL-12) (Die Einzelkomponenten wurden aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie des Universitätsklinikums Würzburg bezogen.)	8,0 g NaCl 1,42 g Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g KCl Auffüllen auf 1 l mit H ₂ O, pH 7.4
Fixierlösung für pp65-Färbung (Die Einzelkomponenten wurden aus dem Institut für Virologie des Universitätsklinikums Würzburg bezogen.)	100 ml Formaldehyd 37% 40 g Saccharose Auffüllen mit PBS auf 1 Liter
Permeabilisierungslösung für pp65-Färbung (Die Einzelkomponenten wurden aus dem Institut für Virologie des Universitätsklinikums Würzburg bezogen.)	10 ml NP40 200 g Saccharose 20 ml FCS Auffüllen mit PBS auf 1 Liter
Ponceau-Lösung	0,1% Ponceau 5% Essigsäure
SDS-Ladepuffer	200 mM Tris pH6.7 15% Glycerin 6% SDS 0,03% Bromphenolblau 10% β -Mercaptoethanol (vor Gebrauch frisch zugeben)
Waschpuffer für ELISA (TNF-α und IL-12) (Die Einzelkomponenten wurden aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie des Universitätsklinikums Würzburg bezogen.)	9,0 g NaCl 1 ml Tween 20 Auffüllen auf 1 l mit H ₂ O, pH 7.4

Tabelle 7: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Lösungen und Puffer.

3.2.5 Medien

Medium	Einzelkomponenten
Bierwürzeplatten zur Kultivierung von <i>A. fumigatus</i> (hergestellt vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie des Universitätsklinikums Würzburg)	Bierwürze
MEM-Medium (für MRC5-Zellen)	500 ml MEM 10% FCS 2 mM Glutamin 1x NEAA 1,5 ml Refobacin
RPMI-Medium (ohne Cytokine)	500 ml RPMI 1640 10% FCS 1,5 ml Refobacin

Tabelle 8: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Medien.

3.2.6 Cytokine und Immunsuppressiva

Klinische Immunsuppressiva	Stammlösung	Hersteller
CellCept (Mycophenolat)	1 mg/ml Hanks	Roche
Everolimus (RAD 40-O-(2-hydroxyethyl-9-rapamycin)	1 mg/ml 100% Ethanol	Novartis
Fortecortin (Dexamethason)	1 mg/ml Hanks	Merck
GM-CSF (Leukine)	250 µg/ml Hanks	Berlex
Interleukin 4	10 µg/ml Hanks	R&D Systems
Mycophenolsäure (MPA)	1 mg/ml Hanks	Novartis
Sandimmun (Cyclosporin A)	1 mg/ml Hanks	Novartis
Solu-Decortin (Cortison-Derivat)	1 mg/ml Hanks	Merck

Tabelle 9: Cytokin- und Immunsuppressivaliste. Die klinischen Immunsuppressiva, mit Ausnahme von Mycophenolat und Everolimus, wurden aus dem Stammzellzentrum des Universitätsklinikums Würzburg von Herrn Dr. Grigoleit bezogen.

3.2.7 TLR-Liganden

TLR	Ligand	Hersteller
TLR2	Zymosan	Invivogen
TLR3	poly I:C	Invivogen
TLR4	LPS LPS ultrarein	Sigma Invivogen
TLR9	CpG DNA (5'- GGGGACGATCGTCGGGGG -3')	Invivogen

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten TLR-Liganden.

3.2.8 Primer

Die Primer zur Analyse der beiden SNPs in *DC-SIGN* wurden bei der Firma BioTeZ GmbH (Berlin-Buch) bestellt. Alle übrigen Primer und Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen. In den folgenden Tabellen sind diese in 5'-3' Richtung aufgelistet.

Rezeptoren, Signaltransduktion und Cytokine		
Gen	Primer	Sequenz (5'-3')
<i>Card-9</i>	Card-9 F	AGG CTC AGG CGG CAG CA
	Card-9 R	CCT GGT GCA GAG CTG CAA
<i>CCL20</i>	CCL20 F	CTG TCT TGG ATA CAC AGA CCG TA
	CCL20 R	GGT TCT TTC TGT TCT TGG GCT A
<i>CXCL10</i>	CXCL10 F	ACG TGT TGA GAT CAT TGC TAC AA
	CXCL10 R	GAT TTT GCT CCC CTC TGG T
<i>CXCL11</i>	CXCL11 F	GGC TGT GAT ATT GTG TGC TAC A
	CXCL11 R	TCG ATT TGG GAT TTA GGC A
<i>DC-SIGN</i>	DC-SIGN F	CTG AGG AGC AGA ACT TCC TAC A
	DC-SIGN R	GCA AGA TTA CAT TTG TCG TCG T
<i>Dectin-1</i>	Dectin-1 F	GCT ATA TCT ATT CAG GGG CTC TC
	Dectin-1 R	ATT ACC AAG CAT AGG ATT CCC A
<i>h-Alas</i>	h-Alas F	AAT GAG TCG CCA CCC ACG
	h-Alas R	CAG CTC CCG CTC TAA GTC CA
<i>IFN-α</i>	IFN- α F	CTG GGA GGT TGT CAG AGC AG
	IFN- α R	CAT AGT TAT AGC AGG GGT GAG AGT CT
<i>IFN-β</i>	IFN- β F	GCC GCA TTG ACC ATC TAT GAG A
	IFN- β R	GAG ATC TTC AGT TTC GGA GGT AAC
<i>IL-6</i>	IL-6 F	CGC AGA ATG AGA TGA GTT GTC
	IL-6 R	CTT TTG GAG TTT GAG GTA TAC CTA G
<i>IL-8</i>	IL-8 F	TCC AGA CAG AGC TCT CTT CCA TC
	IL-8 R	TCT TGG CAG CCT TCC TGA TT
<i>IL-10</i>	IL-10 F	AGC TGA GAA CCA AGA CCC AGA
	IL-10 R	GGG CTG GGT CAG CTA TCC
<i>IL-12p40</i>	IL-12 F	CTC GTG GCC ATA TGG GAA C
	IL-12 R	TGG CCA GCA TCT CCA AAC T
<i>MyD88</i>	MyD88 F	TCC GGC GGC ACC TCT T
	MyD88 R	TGA CCC CCT GGG GCA TAT
<i>PTX-3</i>	PTX-3 F	CGT CGT CCG TGG CTT GC
	PTX-3 R	TCC CAC TGA GGA CCC CAC
<i>Rantes</i>	Rantes F	CGG CAC GCC TCG CTG TCA TC
	Rantes R	GCA AGC AGA AAC AGG CAA AT
<i>TLR2</i>	TLR2 F	TGT CTT GTG ACC GCA ATG GTA
	TLR2 R	GCT TGA ACC AGG AAG ACG AT
<i>TLR3</i>	TLR3 F	GAT GAA ATG TCT GGA TTT GGA CTA
	TLR3 R	GTT AGC TGG CTA TAC CTT GTG A
<i>TLR4</i>	TLR4 F	GGA GCC CTG CGT GGA GA
	TLR4 R	TAT GCC CCA TCT TCA ATT GTC
<i>TLR9</i>	TLR9 F	CCC CCC AGC ATG GGT TT
	TLR9 R	ACA AGG AAA GGC TGG TGA CAT T

<i>TNF-α</i>	TNF-α F	GGC GTT TGG GAA GGT TGG AT
	TNF-α R	CTC TGG CCC AGG CAG TCA GA
SNP-Analysen		
SNP	Primer	Sequenz (5'-3')
<i>EGFR</i> rs10251977	EGFR F	CCA CAC TGA CGT GCC TCT C
	EGFR mis	GAA GGG CAT GAG CTG AG T G
<i>EGFR</i> rs11543848	EGFR F	CCG AGA GCT GCT GGA GC
	EGFR R	AAC AAC CTG GAG CCT TAT TTT TG
<i>DC-SIGN</i> rs2287886	DC-SIGN mis	GGG TAG GGA TCT GTC ATA CAA
	DC-SIGN A	TCC TTC TCC CTG TCA ACC
	DC-SIGN Ext. 2	Biotin – GCT CTG ATG CTT LCC ACT AG
<i>DC-SIGN</i> rs735240	DC-SIGN S	CAG CAA TGA AAA AGC AAA GT
	DC-SIGN A	ATT CTG AGT CTC CTT CAA AGG T
	DC-SIGN Ext. 1	Biotin – GTA CAC ACT GTA AGA TTL GAT TTT
<i>ITGB3</i> rs5921	ITGB3 F	TCC AGG TGA GCT TCA GCA TT
	ITGB3 R	AAC GGC ATA CCC CAC ACT C
<i>ITGB3</i> rs12709459	ITGB3 F	TCC AAT CTT GAG TCC CAT ACA
	ITGB3 R	CTT GCC ATT TCC CGT TT
<i>SDC2</i> rs1042381	SDC2 F	CCA GCA TTT TGA AAG AAC
	SDC2 R	TGT CTG AGC AGG TAT CTT G

Tabelle 11: Primerliste. **Fett** markiert sind eventuell vorhandene *Mismatch*-Basen. Die beiden Primer DC-SIGN Extension (Ext.) 1 und DC-SIGN Ext. 2 zur SNP Analyse von *DC-SIGN* sind Biotin-markiert und enthalten einen Photolinker, der mit **L** gekennzeichnet ist. An dieser Stelle wurde der Primer durch UV-Bestrahlung gespalten (s. 3.6.10).

3.2.9 Sonden

Rezeptoren, Signaltransduktion und Cytokine		
Gen	Sonde	Sequenz (5'-3')
<i>Card-9</i>	Card-9 FL	TGA GAG CTC CTG GGA CCT CCT G
	Card-9 LC	TGA GCC ATC TTC CAG GTC GGA GC
<i>CCL20</i>	CCL20 FL	GTT GTC TGT GTG CGC AAA TCC AAA
	CCL20 LC	CAG ACT TGG GTG AAA TAT ATT GTG CGT C
<i>CXCL10</i>	CXCL10 FL	AGT AAA TTC TTG ATG GCC TTC GAT TCT
	CXCL10 LC	GAT TCA GAC ATC TCT TCT CAC CCT TCT TTT
<i>CXCL11</i>	CXCL11 FL	TGC TTT TAC CCC AGG GCC TAT GC
	CXCL11 LC	GAC AGC GTC CTC TTT TGA ACA TGG
<i>DC-SIGN</i>	DC-SIGN FL	TGT TGC CCA GCT TCA AGC AGT A
	DC-SIGN LC	GGA ACA GAG GAG AGC CCA ACA AC
<i>Dectin-1</i>	Dectin-1 FL	CAA TTA CAC TTC GAC TCT CAA AGC AAT
	Dectin-1 LC	CCA GGA TAG CTG TTG TTT CAG AG
<i>h-Alas</i>	h-Alas FL	CCT GCC CCA GCA CCA TGT TGT TTC
	h-Alas LC	GTG TCC ATA ACT GCC CCA CAC ACC
<i>IFN-α</i>	IFN-α FL	TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGA TTA AGG A
	IFN-α LC	GGA ATA ACA TCT GGT CCA ACA TGA AAA CAA TT
<i>IFN-β</i>	IFN-β FL	AGC CAG GAG GTT CTC AAC AAT AGT CTC AT
	IFN-β LC	CCA GCC AGT GCT AGA TGA ATC TTG TCT G
<i>IL-6</i>	IL-6 FL	TAG ATG CAA TAA CCA CCC CTG ACC CA
	IL-6 LC	CCA CAA ATG CCA GCC TGC TGA C

IL-8	IL-8 FL	GAC ATC TAA GTT CTT TAG CAC TCC TTG GCA
	IL-8 LC	AAC TGC ACC TTC ACA CAG AGC TGC
IL-10	IL-10 FL	CGG CGC TGT CAT CGA TTT CTT CCC T
	IL-10 LC	TGA AAA CAA GAG CAA GGC CGT GGA GC
IL-12p40	IL-12 FL	GGT CCT CAC CTG TGA CAC CCC TGA
	IL-12 LC	AAG ATG GTA TCA CCT GGA CCT TGG ACC
MyD88	MyD88 FL	TCC TGC ACA AAC TGG ATG TCG CT
	MyD88 LC	GGC AAT AGC AGA TGA AGG CAT CGA A
PTX-3	PTX-3 FL	CTC TCT CAT CTG CGA GTT CTC CAG CAT GAT G
	PTX-3 LC	AGA GCT TGT CCC ATT CCG AGT GCT CCT
Rantes	Rantes FL	CCC GTG CCC ACA TCA AGG AGT AT
	Rantes LC	CTA CAC CAG TGG CAA GTG CTC CAA C
TLR2	TLR2 FL	CTA CAG AGG TGT GTG AAC CTC CAG GC
	TLR2 LC	CTG GTG CTG ACA TCC AAT GGA ATT AAC
TLR3	TLR3 FL	AAG TGC ACT GTT AGC CAT GAA GTT GC
	TLR3 LC	GAC TGC AGC CAC CTG AAG TTG ACT
TLR4	TLR4 FL	CCC TTC ACC CCG ATT CCA TTG CT
	TLR4 LC	CTT GCT AAA TGC TGC CGT TTT ATC ACG
TLR9	TLR9 FL	GGT GAA CTG CAA CTG GCT GTT CCT
	TLR9 LC	AGT CTG TGC CCC ACT TCT CCA TGG
TNF- α	TNF- α FL	GCA TTG GCC CGG CGG TTC
	TNF- α LC	CCA CTG GAG CTG CCC CTC AGC T
SNP-Analysen		
SNP	Sonde	Sequenz (5'-3')
EGFR rs10251977	Sensor A	ACC TCC ACC GTG CAA CTC AT
	Anchor EGFR	CGC CTG CTG GGC ATC TGC CT
EGFR rs11543848	Sensor A	AGC CCA AGG ACT GCG TCT CT
	EGFR Anchor	GCC GGA ATG TCA GCC GAG GCA
ITGB3 rs5921	Sensor mut	CAA GGA CAG CCT GAT CAT CCA GGT C
	Anchor ITGB3	CCT TTG ATT GTG ACT GTG CCT GCC AGG
ITGB3 rs12709459	Sensor mut	CCG TTC TAA AGT CGA GCT GGA A
	Anchor ITGB3	TGC GTG ACC TCC CTG AAG AGT TGT C
SDC2 rs1042381	SDC2 mut	GAG CTG ACA ACA ACT CGA CC
	SDC2 mut short	GCT GAC AAC AAC TCG ACC
	SDC2 Anchor	CTT CCA AAGATA CTG TTG ACT AGT GCT GC

Tabelle 12: Sondenliste. **Fett** markiert sind eventuell vorhandene *Mismatch*-Basen.

3.2.10 siRNAs

Die siRNA-Duplexe wurden von QIAGEN mit Hilfe eines Algorithmus von Novartis entworfen und synthetisiert. Alle siRNAs waren jeweils 21 bp lang und besaßen am 5'-Ende einen zwei Nukleotid langen Überhang. In den meisten Fällen waren die siRNAs so konstruiert, dass sie einen anderen Bereich abdeckten als der, der später mittels RT-PCR amplifiziert wurde (s. 7.4). Folgende siRNA's wurden von QIAGEN bezogen:

siRNA	Sense / Antisense Sequenz
Card-9 siRNA (1)	r(GGU CAU CCG CAA ACG GAA A)dTdT r(UUU CCG UUU GCG GAU GAC C)dAdG
Card-9 siRNA (2)	r(GUA AGG ACU CCA AGA UGU A)dTdT r(UAC AUC UUG GAG UCC UUA C)dGdT
DC-SIGN siRNA	r(GGA ACG ACG ACA AAU GUA A)dTdT r(UUA CAU UUG UCG UCG UUC C)dAdG
Dectin-1 siRNA (1)	r(AAC UUA UUU CAG AUC AGA A)dTdT r(UUC UGA UCU GAA AUA AGU U)dAdG
Dectin-1 siRNA (2)	r(CUG UGG AAU UCA AAG GAU A)dTdT r(UAU CCU UUG AAU UCC ACA G)dCdT
Dectin-1 siRNA (3)	r(GGA UAG CUG UUG UUU CAG A)dTdT r(UCU GAA ACA ACA GCU AUC C)dTdG
Dectin-1 siRNA (4)	r(GGU UGA ACU ACU UAA GCU U)dTdT r(AAG CUU AAG UAG UUC AAC C)dAdG
MyD88 siRNA (validiert)	von Qiagen nicht bekanntgegeben
PTX-3 siRNA	r(GGG AUA GUG UUC UUA GCA A)dTdT r(UUG CUA AGA ACA CUA UCC U)dAdG
TLR2-1siRNA	r(GGG CAG UCU UGA ACA UUU A)dTdT r(UAA AUG UUC AAG ACU GCC C)dAdG
TLR2-2 siRNA	r(GCA ACU CAA AGA ACU UUA U)dTdT r(AUA AAG UUC UUU GAG UUG C)dGdG
TLR3-1 siRNA	r(GCA CAA UGA GCU AUC UCA A)dTdT r(UUG AGA UAG CUC AUU GUG C)dTdG
TLR3-2 siRNA	r(GAG UUA GAU AUG CGC UUU A)dTdT r(UAA AGC GCA UAU CUA ACU C)dAdG
TLR4-1 siRNA	r(AGG UGG GCA UUU CAA CCA A)dTdT r(GAU UAG CAU ACU UAG ACU A)dTdT
TLR4-2 siRNA	r(UUG GUU GAA AUG CCC ACC U)dGdG r(UAG UCU AAG UAU GCU AAU C)dGdG
TLR9-1 siRNA	r(GCA ACU GUU AUU ACA AGA A)dTdT r(UUC UUG UAA UAA CAG UUG C)dCdG
TLR9-2 siRNA	r(AGC UUA ACC UGU CCU UCA A)dTdT r(UUG AAG GAC AGG UUA AGC U)dTdG
<i>non-silencing</i> siRNA	r(UUC UCC GAA CGU GUC ACG U)dTdT r(ACG UGA CAC GUU CGG AGA A)dTdT
Cy3-markierte siRNA	unbekannt

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten siRNAs unter Angabe der jeweiligen Sequenz in *sense* und *antisense* Orientierung, einschließlich der zwei Nukleotid langen Überhänge.

3.2.11 Antikörper

FACS Antikörper	Konjugation	Herkunft	Verdünnung
IgG ₁ Isotypkontrolle (Becton Dickinson)	PE	Maus	2 µl / 1x10 ⁶ Zellen
IgG _{2a} Isotypkontrolle (Becton Dickinson)	FITC		
IgG _{2a} Isotypkontrolle (Becton Dickinson)	PE		
α-CD1a IgG _{2a} (DakoCytomation)	FITC		
α-CD14 IgG _{2a} (Becton Dickinson)	FITC		
α-CD40 IgG ₁ (Immunotech)	PE		
α-CD80 IgG ₁ (Becton Dickinson)	PE		
α-CD83 IgG ₁ (Becton Dickinson)	PE		
α-CD86 IgG ₁ (Becton Dickinson)	PE		
α-IFN-γ IgG ₁ (Becton Dickinson)	PE		
α-TLR2 IgG _{2a} (Ebioscience)	FITC		
α-TLR3 IgG ₁ (Ebioscience)	PE		
α-TLR4 IgG _{2a} (Ebioscience)	PE		
Primäre Antikörper	Konjugation	Herkunft	Verdünnung
α-β-Actin (Sigma)	-	Maus	1 µg/ml
α-CD14 (Miltenyi)	Microbeads	Maus	150 µl / 1x10 ⁸ PBMCs
α-Dectin-1 IgG _{2B} (R&D)	-	Maus	1 µg/ml
α-IE (DakoCytomation)	-	Maus	1:20
α-pp65 (Argene)	-	Maus	1:20
α-TLR2 IgG (Imgenex)	-	Kaninchen	1 µg/ml
α-TLR4 IgG _{2a} (Imgenex)	-	Maus	1 µg/ml
IgG Isotypkontrolle (R&D)	-	Kaninchen	1 µg/ml
IgG _{2B} Isotypkontrolle (R&D)	-	Maus	1 µg/ml
Sekundäre Antikörper	Konjugation	Herkunft	Verdünnung
α-Maus IgG (Sigma)	AP	Ziege	1:3.000
α-Maus IgG für IE-Färbung (DakoCytomation)	FITC	Ziege	1:20
α-Maus IgG für pp65-Färbung (Argene)	FITC	Ziege	1:200
α-Maus IgG (Biorad)	HRP	Ziege	1:3.000
α-Kaninchen IgG (Biorad)	HRP	Ziege	1:3.000

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Antikörper unter Angabe der Konjugation, der Herkunft und der eingesetzten Verdünnung.

3.3 Arbeiten mit HCMV

3.3.1 Kultivierung von humanen Fibroblasten

HCMV kann in verschiedenen Wirtszellen angezüchtet werden. Vorzugsweise werden hierfür humane Vorhautfibroblasten (HFF) von Neugeborenen oder MRC5-Zellen verwendet. Erstere sind zwar günstiger in der Anschaffung, aber auch schwieriger zu bekommen. Daher wurde auf MRC5-Zellen, die bei Sigma bestellt wurden, zurückgegriffen. Bei den MRC5-Zellen handelt es sich um humane Lungenfibroblasten, die in MEM-Medium mit 10% FCS plus 2 mM Glutamin, Refobacin und nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA) kultiviert wurden. Die genauen Angaben zu den verwendeten Medien und Lösungen befinden sich im Materialteil in den Abschnitten 3.2.3 bis 3.2.5.

Neu bestellte MRC5-Zellen von der Firma Sigma befanden sich zwischen Passage 20 und 22 in einer 25 cm² Zellkulturflasche, die vollständig mit Medium gefüllt war. Zunächst wurde das Medium bis auf ca. 20 ml abgegossen und die Zellen bei 37°C im Brutschrank bis zum nächsten Tag ruhen gelassen. Um die Zellen zu vermehren und in größere Flaschen zu passagieren, wurden je nach Größe der Zellkulturflaschen, definierte Mengen an ATV bzw. Trypsinlösung zugegeben (s. Tabelle 15) und für 10-15 min bei 37°C inkubiert. Zwischendurch wurde die Zellkulturflasche zur besseren Ablösung der Zellen geschwenkt und die Zellen unter dem Mikroskop dahingehend kontrolliert, ob sie sich vollständig abgelöst und abgerundet hatten. Anschließend wurden die Zellen mit der Pipette gemischt und in neue Zellkulturflaschen überführt. Vor der Kultivierung der Zellen im Brutschrank wurden folgende Mengen an Medium zugegeben:

Zellkulturflasche	ATV	Medium
25 cm ²	2 ml	7 ml
80 cm ²	6 ml	20 ml
175 cm ²	12 ml	40 ml

Tabelle 15: Mengenangabe für ATV bzw. Trypsinlösung und Medium zur Kultivierung von MRC5-Zellen in verschieden großen Zellkulturflaschen.

Die Zellen wurden jeden Tag unter dem Mikroskop auf Zustand und Dichte beurteilt und nach 2-3 d erneut passagiert.

Praktischerweise konnten die MRC5-Zellen bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit ATV abgelöst, in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt, mit Medium auf 30 ml aufgefüllt und die Zellzahl ermittelt (s. Abschnitt 3.5.2). In der Zwischenzeit wurden die Fibroblasten bei 1.300 rpm für 10 min zentrifugiert, dekantiert und auf Eis gestellt. Zu je 5×10^6 Zellen wurde jeweils 1 ml kaltes Medium mit 10% DMSO zugegeben und die Zellen rasch in 1 ml Aliquots bei -80°C eingefroren.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurden diese in ein 37°C Wasserbad gestellt und dann in ein 50 ml Falcon überführt, das vollständig mit Medium gefüllt wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1.300 rpm für 10 min, wurde dekantiert und die Zellen in 20 ml Medium aufgenommen und in eine 80 cm^2 Zellkulturflasche gegeben.

3.3.2 Anzucht von HCMV in Fibroblasten

Der klinisch relevante HCMV Stamm TB40E wurde vom Institut für Virologie der Universität Tübingen (Dr. Riegler) und der Universität Erlangen (Prof. Mach) bezogen und für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente in MRC5-Zellen vermehrt. Dazu wurden die MRC5-Zellen in einer 175 cm^2 Zellkulturflasche bis zu einer Dichte von ca. 80-90 % vermehrt und dann das Medium abgegossen. Die Infektion erfolgte durch Zugabe von 3 ml Medium plus 4 ml Viruslösung, welche zuvor gemischt und mit einer Spritze resuspendiert wurde. Es folgte eine Inkubation für mindestens 2 h bei 37°C , wobei alle 15 min, die Zellkulturflasche geschwenkt wurde, um eine gleichmäßige Infektion der Zellen zu gewährleisten. Nach 2 h wurde mit Medium auf ca. 40-50 ml aufgefüllt und die Zellen im Brutschrank für 7-10 d weiterkultiviert. Sobald 90% der Zellen einen CPE zeigten, wurde der Mediumüberstand mit dem Virus abgenommen und vorhandene Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 3.000 rpm für 10 min entfernt. Der Virus-Stock wurde in 2 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

3.3.3 Viruskonzentrierung

Um Immunzellen mit einer genügend großen Effizienz zu infizieren, bedurfte es einer Konzentrierung der Virussuspension. Dazu wurde der Mediumüberstand mit den extrazellulären Viruspartikeln bei 23.000 rpm ($\sim 80.000 \text{ g}$) für 70 min bei 10°C in der Ultrazentrifuge konzentriert. Nachdem das Medium abgeleert wurde, wurde jedes Viruspellet in 250 μl Medium aufgenommen. Das derart gewonnene Viruskonzentrat

wurde mit der Spritze resuspendiert und konnte entweder in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert oder direkt zur Infektion verschiedener Immunzellen verwendet werden.

Um die Virusausbeute zu erhöhen wurde parallel zur Konzentrierung des Zellüberstandes ein Zellaufschluss durchgeführt, um intrazelluläre Viruspartikel zu gewinnen. Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin behandelt, in Medium aufgenommen und für 60 min bei 10.000 rpm und 10°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Durch dreimaliges Einfrieren für 5 min in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen bei 37°C für 5 min, erfolgte der Zellaufschluss. Das Lysat wurde für 10 min bei 3.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit den freigesetzten Viren analog zur Ernte von extrazellulären Partikeln konzentriert.

3.3.4 Virustitration nach der Endpunktverdünnungsmethode

Zur Bestimmung der infektiösen Einheiten des Viruskonzentrates wurden zunächst $1,5 \times 10^4$ MRC5-Zellen / Well / 200 µl Medium in einer 96-Well-Platte üN kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgezogen und 100 µl Virusverdünnung (Dreifachbestimmungen: 10^{-1} - 10^{-8} in Medium) für 4 h zugegeben. Anschließend wurde das Medium abgenommen, durch 200 µl frisches Medium ersetzt und üN inkubiert.

Direkt in der 96-Well Platte erfolgte der Infektionsnachweis durch eine IE-Färbung, indem die Zellen mit 200 µl Hanks für 5 min gewaschen und mit Ethanol für 15 min fixiert wurden. Nach einem 5 minütigen Waschschrift mit Hanks wurde je 50 µl IE-Ak (1:20 mit Hanks verdünnt) für 1 h bei 37°C zugegeben. Danach wurde dreimal mit Hanks gewaschen und die Zellen in je 50 µl sek. Ak (1:20 verdünnt) für 1h bei 37°C inkubiert. Nach dreimal Waschen wurde für 15 min an der Luft getrocknet und die einzelnen Wells am inversen Fluoreszenzmikroskop auf positiv und negativ beurteilt. Die Anzahl der infektiösen Partikel der Stammsuspension ermittelte sich aus der letzten Verdünnung, in der noch wenige Kerne in der Immunfluoreszenz positiv waren, nach der der Methode von Reed und Münch, 1938.

3.3.5 Infektion von Immunzellen

Zu 1×10^6 Immunzellen / Well wurde Viruskonzentrat in einer MOI von 10 zugegeben. Nach einer Infektionszeit von 2 h im Brutschrank wurden die Zellen aufgenommen, bei 1.300 rpm für 10 min abzentrifugiert und mit Hanks-Puffer gewaschen. Da-

nach wurden die Zellen mit 1 ml frischem Medium versetzt und für 24 h bis zur weiteren Analyse kultiviert.

3.3.6 Cytospin-Präparation und Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Ermittlung, wie viele Immunzellen mit HCMV infiziert waren, wurden zuerst geeignete Präparate hergestellt: 2×10^5 Zellen / 100 μ l wurden entweder mittels Cytospin-Zentrifuge bei 900 rpm, für 3 min auf Objektträger aufzentrifugiert, oder auf 8-Feld Objektträger aufgetropft. Die derart hergestellten Präparate wurden für 1h bei 37°C oder üN bei RT getrocknet.

Der Nachweis der Infektion wurde mittels zwei verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen (IE- und pp65 Färbung) durchgeführt. Bei der IE-Färbung wurden die Zellen für 10 min bei -20°C in Aceton fixiert und an der Luft getrocknet. 50 μ l α -IE Antikörper (s. 3.2.11) wurde in einer 1:20 Verdünnung in PBS zugegeben und bei 37°C in einer feuchten Kammer für 1h inkubiert. Daraufhin wurde je einmal für 5 min mit PBS + 0,1% Tween und PBS gewaschen. Die Inkubation des sekundären Antikörpers (1:20 Verdünnung in PBS, plus 1% Evans Blue, s. 3.2.11) erfolgte ebenfalls für 60 min bei 37°C. Vor seiner Verwendung wurde der angesetzte Antikörper kurz zentrifugiert, um mögliche Kristalle, die sich in der Evans Blue-Lösung befinden, zu entfernen. Evans Blue ist ein Farbstoff, der das Cytoplasma der Zellen rötlich anfärbt. Vor dem Eindecken mit Fluokeep wurde genauso gewaschen wie nach der Inkubation mit dem primären Antikörper.

Bei der pp65-Färbung wurde, wie folgt beschrieben, vorgegangen: anfangs wurden die Zellen für 10 min fixiert und für 5 min permeabilisiert. Die hierfür verwendeten Lösungen sind unter Abschnitt 3.2.3 detailliert beschrieben.

Nach einem 5-minütigem Waschschrift in PBS (+ 1% FCS) wurde 50 μ l primärer α -pp65 Antikörper (s. 3.2.11) in einer 1:20 Verdünnung zugegeben und für 45 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Dann wurde zweimal mit PBS (+ 1% FCS) für je 5 min gewaschen und der sekundäre Antikörper (s. 3.2.11) in einer 1:200 Verdünnung (+ 1% Evans Blue) hinzugefügt. Nach 45 min Inkubation wurde erneut zweimal mit PBS (+ 1% FCS) gewaschen und die Präparate mit Fluokeep eingedeckt. Sämtliche Präparate konnten bei -20°C eingefroren und zur Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop erneut aufgetaut werden.

3.4 Arbeiten mit *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus Konidien und Keimschläuche (Stamm: ATCC 9197) wurden im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg hergestellt.

Zur Präparation von *A. fumigatus* Konidien wurde ein Aliquot des Ausgangsstammes auf Bierwürzeplatten (s. 3.2.5) ausgestrichen und für mehrere Tage kultiviert. Sobald die Platte dicht bewachsen war, wurde steriles Wasser zugegeben und die hydrophoben Konidien mit einem Wattestäbchen abgelöst. Nach Vereinzeln der Konidien mit Hilfe eines *Cell Strainers* wurden die Konidien gezählt. Zur Herstellung von Keimschläuchen wurden Konidien in RPMI (+ 5% FCS) aufgenommen, üN bei RT synchronisiert und für weitere 3-4 h bei 37°C die Auskeimung induziert. Anschließend wurde die Morphologie unter dem Mikroskop kontrolliert und die Zellzahl ermittelt (3.5.2).

Die jeweiligen Zustandsformen der Pilze wurden bis zu ihrer Inkubation mit Immundefektorzellen bei -20°C (Keimschläuche) bzw. bei 4°C (Konidien) gelagert. Wenn wie in wenigen Fällen (s. 4.6.3) nicht mit lebenden Pilzen gearbeitet wurde, wurden Keimschläuche für 15 min bei RT mit 70% Ethanol inaktiviert und anschließend dreimal mit RPMI (+ 5% FCS) gewaschen. Die Vitalität wurde durch Ausstreichen und Kultivierung für mehrere Tage auf Bierwürzeplatten überprüft.

3.5 Arbeiten mit Immundefektorzellen

3.5.1 Isolierung von PBMC's

Zur Isolierung von humanen „*peripheral blood mononuclear cells*“ (PBMC's) wurde Blut aus einem *Buffy Coat*, der vom Blutspendedienst Frankfurt bezogen wurde, verwendet. Dabei handelt es sich um erythrocytenabgereichertes Zellkonzentrat von gesunden Spendern. Alternativ zu den *Buffy Coats* konnte auf frisch abgenommenes Blut zurückgegriffen werden.

Das Blut wurde in einer Zellkulturflasche mit Hanks im Verhältnis von 1:1 verdünnt. In einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurden je 20 ml vom Kohlenhydrat-Polymer FICOLL® ($\rho = 1,077 \text{ g/ml}$) vorgelegt und vorsichtig mit 25 ml verdünntem Blut überschichtet. Mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 2.000 rpm für 20 min sammelten sich auf der Interphase die mononukleären Zellen (PBMC's), die überwiegend aus Lymphocyten und Monocyten bestanden. Erythrocyten aggregierten und wanderten, ebenso

wie die polymorphkernigen Leukocyten aufgrund ihrer größeren Dichte, zum Boden des Falcon-Röhrchens. Anschließend konnte die Interphase mit einer Pasteurpipette abgesaugt und vereinigt werden. Das folgende Auffüllen mit Hanks auf 50 ml, das Zentrifugieren bei 1.300 rpm für 10 min und das Dekantieren, diente als Waschschrift und wurde zweimal wiederholt. Die so über einen Ficoll-Gradienten gewonnenen PBMC's konnten für die Dauer der Zellzahlbestimmung auf Eis gelagert werden (s. 3.5.2).

3.5.2 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Anzahl an lebenden Zellen erfolgte mit dem Azofarbstoff Trypanblau. Trypanblau hat die Eigenschaft, dass es nur in tote Zellen eindringt und somit vitale Zellen ungefärbt lässt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zunächst 1:10 mit Hanks und dann nochmals 1:2 mit Trypanblau verdünnt, um dieses in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop auszuzählen.

Bei der Zählkammer handelt es sich um einen speziellen Objektträger, der folgenden Aufbau hat: Auf der Oberfläche sind zwei 3 x 3 mm große Zählnetze eingraviert, wovon sich jedes aus neun 1 x 1 mm großen Quadraten zusammensetzt (s. Abbildung 8). Der Abstand zwischen Deckglas und Objektträger hat eine Kammertiefe von 0,1 mm. Daraus errechnet sich für eines der Großquadrate ein Volumen von $1/10^4$ ml (1 mm x 1 mm x 0,1 mm). Zur besseren Zählbarkeit der Zellen in einem Großquadrat, ist jedes in 16 kleinere Quadrate von 0,25 x 0,25 mm Länge unterteilt. Bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Zellsuspension müssen das Gesamtvolumen und die 1:20 Verdünnung mit Hanks bzw. Trypanblau mit berücksichtigt werden. Daher errechnet sich die Gesamtzellzahl wie folgt: $\text{Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Gesamtvolumen} \times 20$.

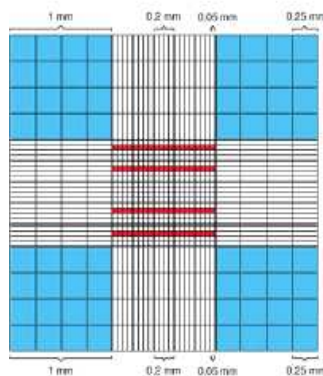


Abbildung 8: Gitternetz der Neubauer-Zählkammer.

3.5.3 Isolierung von CD14-positiven Zellen mittels MACS-System

Anschließend an die Isolierung der PBMC's (s. 3.5.1) erfolgte die Aufreinigung von CD14-positiven Zellen. CD14 ist ein Marker für Monozyten und mit Hilfe von an Microbeads gekoppelten α -CD14-Antikörpern können diese markiert und selektiert werden. Die Selektion beruht darauf, dass eine MACS-Trennsäule in ein magnetisches Feld gebracht wird, wodurch die mit Antikörper besetzten Zellen zurückgehalten werden. Alle nicht markierten Zellen, überwiegend Lymphocyten, laufen hindurch und werden somit ausgesondert. Nach Entnahme der Säule aus dem Magneten können die Monozyten von der Säule eluiert und gesammelt werden.

Zur Durchführung wurden die PBMC's zunächst bei 1.300 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 800 μ l Hanks (+ 2 mM EDTA + 1% FCS) pro 1×10^8 Zellen aufgenommen. Nach Aufteilung auf verschiedene Ansätze à 850 μ l, wurden 150 μ l α -CD14-Microbeads zugegeben und im Kühlschrank für 15 min inkubiert. Die einzelnen Ansätze wurden auf ca. 20 ml mit Hanks (+ 2 mM EDTA + 1% FCS) aufgefüllt und, wie oben beschrieben, abzentrifugiert. In dieser Zeit konnten die MACS-Trennsäulen in die Magnethalter eingesetzt und mit 3 ml Hanks (+ 2 mM EDTA + 1% FCS) vorgespült werden. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in 1 ml Hanks (+ 2 mM EDTA + 1% FCS) resuspendiert und auf die Säule gegeben. Um zu vermeiden, dass die Trennsäule nicht verstopft, sollten nicht mehr als $1,5 \times 10^8$ Zellen pro Säule verwendet werden. Die Säulen wurden dreimal mit je 3 ml Hanks (+ 2 mM EDTA + 1% FCS) gespült, dann aus dem Magnethalter genommen und die positiv selektierten Zellen mit 2 ml Hanks (+ 2 mM EDTA + 1% FCS) aus der Säule gedrückt. Zur Zellzahlbestimmung wurde auf 10 ml mit Hanks (+ 2 mM EDTA + 1% FCS) aufgefüllt und ein Aliquot, wie unter Abschnitt 3.5.2 beschrieben, ausgezählt.

3.5.4 Generierung von dendritischen Zellen

Durch Zugabe von geeigneten Cytokinen lassen sich *in vitro* aus Monozyten unreife dendritische Zellen (iDCs) differenzieren (Romani *et al.*, 1996; Grigoleit *et al.*, 2002). Monozyten wurden, wie unter Abschnitt 3.5.1 und 3.5.3 beschrieben, isoliert und durch Zentrifugation bei 1.300 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, die CD14-positiven Zellen zur Resuspension über ein Gitter aufgeschüttelt und in 3 ml RPMI Medium (+ 10% FCS) pro $2,5 \times 10^6$ Zellen aufgenommen. Zur Dif-

ferenzierung wurde IL-4 (20 ng/ml) und GM-CSF (100 ng/ml) zugegeben. Die Zellen wurden auf 6-Well-Platten verteilt, wobei je 3 ml Zellsuspension in ein Well gegeben wurde. Es folgte eine Inkubation der Zellen im Brutschrank für fünf bis sieben Tage. Alle zwei Tage wurde 1 ml Medium pro Well abgenommen und durch frisches RPMI-FCS-Medium, mit derselben Menge an Cytokinen, ersetzt. Der Grad der Differenzierung der DCs wurde anhand ihrer besonderen Morphologie unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach ihrer Differenzierung wurden die Zellen unter mehrfachem Spülen abgesammelt und bei 1.300 rpm für 10 min konzentriert und gezählt (s. 3.5.2).

3.5.5 Isolierung von Granulozyten

Mit Hilfe einer speziellen Biocoll-Trennlösung (Polymorphprep) können neutrophile Granulozyten (*polymorphonuclear neutrophils*, PMNs) aus Blut aufgereinigt werden (Braedel *et al.* 2004). Da Granulozyten nur eine kurze Lebensdauer (2-3 d) haben, wurde für die durchgeführten Experimente immer frisch abgenommenes Blut verwendet (20 ml).

Vor der Aufreinigung wurde Hanks-Puffer bei 37°C vorgewärmt und 10 ml zum Blut zugegeben. Je 5 ml Polymorphprep wurde in ein 15 ml Falcon Röhrchen vorgelegt und mit 5 ml verdünntem Blut bei 1.600 rpm für 35 min (bei RT, ohne Bremse) zentrifugiert. Die einzelnen Bestandteile des Blutes wurden durch den Polymorphprep, wie in Abbildung 9 dargestellt, aufgetrennt:

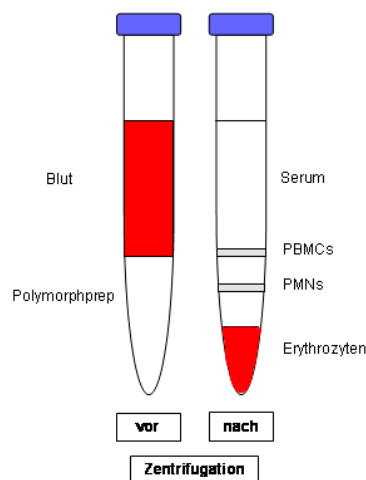


Abbildung 9: Prinzip zur Isolierung von Granulozyten mittels Polymorphprep.

Die Granulozytenschicht wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, 4 Ansätze in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt und auf 50 ml mit Hanks aufgefüllt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1.700 rpm für 7 min (RT, mit Bremse) bevor der Überstand dekantiert wurde. Durch Zugabe von 5 ml kaltem ACK-Puffer für 5 min bei RT wurden noch vorhandene Erythrozyten lysiert und mittels Zentrifugation bei 1.800 rpm für 2 min (RT, mit Bremse) und Dekantieren des Überstandes entfernt. Falls das Pellet noch rot war, wurde der Waschschrift mit Hanks und der Lyseschrift wiederholt. Derart isolierte Granulozyten wurden in 5 ml RPMI (+ 5% FCS) aufgenommen und die Zellzahl bei einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau, wie unter Abschnitt 3.5.2 beschrieben, ermittelt. Erwartungsgemäß konnte mit dieser Methode aus 20 ml Blut ca. 20 Mio Granulozyten isoliert werden.

Die Zellzahl wurde auf 4 Mio Granulozyten / ml eingestellt. Eine Lagerung war bis zur weiteren Verwendung bei RT für maximal 2-3 h Stunden möglich.

3.5.6 Oxidativer Burst

Granulozyten sind in der Lage, Pathogene durch den Einsatz von Sauerstoffradikalen abzutöten. Dieser Vorgang wird als *Oxidativer Burst* bezeichnet und kann *in vitro* mit Hilfe von Dichlorfluorescein (DCF) untersucht werden (Radsak *et al.*, 2004). DCF wird durch eventuell vorhandene Sauerstoffradikale oxidiert und ändert dadurch sein Emissionsverhalten. Je mehr Sauerstoffradikale von den Granulozyten gebildet werden, desto mehr DCF wird oxidiert, was fluorimetrisch nachgewiesen werden kann.

Während der ELISA-Reader auf 37°C vorgewärmt wurde, wurde in eine 96-Well-Platte 50 µl Ligand, Immunsuppressiva oder Pilz in der zu untersuchenden Verdünnung vorgelegt. Für alle Versuche wurde eine geeignete Negativkontrolle (50 µl Flüssigkeit, ohne dass darin die zu testende Substanz gelöst war) und eine Positivkontrolle (Phorbol 12-myristat-13-acetat, PMA, in einer Endkonzentration von 50 ng/ml) mitgeführt.

Die Granulozyten wurden in einer sterilen Wanne mit 0,2 µl DCF / 5 ml Zellen (Endkonz. 2,5 µM) vermischt und je 50 µl mit einer Multipipette pipettiert, so dass sich 200.000 Zellen pro Well befanden. Es folgte eine Kinetikmessung mit 30 Zyklen bei 37°C, wobei automatisch alle 5 min die jeweilige Fluoreszenzintensitäten gemessen und gespeichert wurden. Die Auswertung erfolgte in Microsoft Excel.

3.5.7 Durchflusszytometrie

In einem Durchflusszytometer werden Zellen in einer Trägerflüssigkeit (*sheath fluid*) einzeln durch einen Laserstrahl geführt und so zur Eigenfluoreszenz angeregt. Das resultierende Fluoreszenz- und Streulicht wird von verschiedenen Lichtdetektoren (*Photomultiplier*) aufgefangen und nach Intensität und Farbe getrennt vom Computer registriert. So wird für jede einzelne gemessene Zelle eine charakteristische Kombination von optischen Eigenschaften aufgezeichnet und vom Computer ausgewertet. Zu diesen optischen Eigenschaften gehören die Vorwärtsstreuung (*forward scattering*, FSC), die mit der Zellgröße korreliert und die Seitwärtsstreuung (*side scattering*, SSC), die ein Maß für die Granularität der Zellen ist. Durch die Verwendung von Antikörpern, die gegen Oberflächenmoleküle der Zellen gerichtet sind, können diese markiert und einzelne Zellpopulationen, auf ihre Reinheit hin, bestimmt werden.

Die zu analysierenden Zellen wurden in einer Verdünnung von $1 \times 10^6 / 1$ ml Hanks (+ 10% FCS) gelöst und je 200 μ l Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 μ l Antikörper bzw. 1 μ l Isotypenkontrolle wurde der Ansatz lichtgeschützt für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 1.300 rpm für 10 min zentrifugiert und 2 ml Hanks (10% + FCS) zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 200-500 μ l Hanks (+ 10% FCS) gelöst und im Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *CellQuest Software* von Becton Dickinson. Wenn die Zellen nicht direkt nach der Färbung analysiert wurden, konnten sie mit 1% Paraformaldehyd fixiert und eingefroren werden.

3.5.8 Intrazelluläre FACS-Analyse

Mit einem Durchflusszytometer können Zellen nicht nur anhand bestimmter Oberflächenmoleküle analysiert werden. Auch intrazellulär lokalisierte Proteine (z.B. IFN- γ) lassen sich nachweisen. Hierfür ist es allerdings erforderlich, die Zellen vor der Antikörper-Inkubation zu fixieren und zu permeabilisieren.

Zunächst wurden $1 \times 10^6 /$ ml DCs in ein FACS-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation für 5 min bei 1.300 rpm pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen durch Zugabe von 100 μ l Hanks (+ 2% Formaldehyd) für 15 min bei RT fixiert. Die Fixierung wurde durch Hinzufügen von 100 μ l RPMI (+ 10% FCS) abgestoppt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und dem Dekantieren des Überstandes

wurde mit 50 µl Hanks (+ 1% FCS + 0,5% Saponin) permeabilisiert. Gleichzeitig wurden 2,5 µl des gewünschten Antikörpers bzw. der Isotypkontrolle zugegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Vor dem nächsten Zentrifugieren wurden erneut 150 µl Hanks (+ 1% FCS + 0,5% Saponin) zugefügt. Nach dem Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Hanks (+ 2% Formaldehyd) gewaschen, erneut zentrifugiert und dann in 250 µl Hanks (+ 2% Formaldehyd) aufgenommen. Derart gefärbte Zellen konnten bis zur Analyse am Durchflusszytometer bei -20°C eingefroren werden.

3.5.9 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine von mehreren Möglichkeiten, Zellen zu transfizieren. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass ein kurzer elektrischer Stromstoß die Zellmembran kurzzeitig permeabel macht und somit kleinere Moleküle, wie z.B. siRNAs, in die Zelle eingeschleust werden können.

In speziellen 4 mm Elektroporationsküvetten wurden 1×10^6 DCs, in einem Volumen von 100 µl RPMI (ohne FCS und Cytokine), mit 6,6 µl siRNA bzw. non-silencing-Kontrolle gemischt. Dies entsprach einer Konzentration an siRNA von 133nM. Die Elektroporation erfolgte bei 340 V für 10 ms, woran sich eine Inkubation von 15 min bei RT anschloss, bevor die Zellen in eine 24-Well-Platte überführt wurden. Nach Spülen der Küvetten mit je 100 µl RPMI-Medium (+ FCS + Cytokine) und Zugabe von 800 µl Voll-Medium, erfolgte die Kultivierung bis zur weiteren Analyse im Brutschrank.

3.5.10 Phagozytose-Assay und DAPI-Färbung

Der Nachweis der Phagozytose erfolgte durch eine mikroskopische Untersuchung, bei der die Pilze mit dem Farbstoff FITC und die Zellen mit DAPI angefärbt wurden. Hierfür wurden zunächst 1×10^7 *A. fumigatus* Konidien bzw. KS / 1 ml RPMI + 5% FCS mit 0,1 mg FITC gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Hanks wurde 1 ml frisches Medium zugegeben.

Anschließend wurden 100 µl gefärbter Pilz (1×10^6) für verschiedene Zeitpunkte (30 min, 60 min) mit 1×10^6 Zellen / 100 µl Medium bei 37°C co-kultiviert und mittels Cytospin-Präparation (80 µl, 10 min, 1.200 rpm) auf Objektträger aufzentrifugiert. Nachdem die Präparate für 15 min mit 200 µl Paraformaldehyd (3,7%) fixiert waren, wurde

mehrmals mit Hanks gespült und anschließend 200 µl DAPI-Färbelösung (4,8 µl DAPI + 1.200 µl PBS) für 30 min zugegeben. Nach erneutem Spülen mit Hanks wurden die Präparate mit Fluokeep eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop dahingehend ausgewertet, wie viele Konidien und KS intrazellulär nachzuweisen waren.

Eine dreidimensional wirkende Ansicht der Präparate wurde dadurch erreicht, dass die Zellen (alternativ zur Cytospin-Präparation) in einer 24-Well-Platte auf einem Glasplättchen mit den FITC-markierten Pilzen co-inkubiert wurden. Anschließend wurde 1x mit Hanks gewaschen, für 15 min mit 3,7% Paraformaldehyd fixiert und mit 1% TritonX für weitere 15 min permeabilisiert. Es wurde erneut gewaschen und das Zytoskelett mit dem Farbstoff Phalloidin-Alexa (1:50 mit Hanks verdünnt + 1,5% Magermilchpulver + 2% FCS) gefärbt. Nach 30 min wurde für 10 min DAPI-Färbelösung zugegeben. Die Glasplättchen wurden 3x gewaschen, umgekehrt mit Eindeckmedium auf Objektträger aufgelegt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.6 Arbeiten mit RNA und DNA

3.6.1 Isolierung von Total-RNA aus humanen Zellen

Mit Hilfe zweier Kits von Qiagen ist es möglich, Total-RNA aus humanen Zellen zu isolieren. Der *QIAshredder-Kit* (lila Säulen) erlaubt einen einfachen Zellaufschluss durch Zentrifugation, wobei die Zellen durch eine speziell konstruierte Membran gepresst und dabei lysiert werden. Anschließend kann mit dem *RNeasy-Kit* (rosa Säulen), die in den Zellen vorhandene RNA an die Silica-Matrix einer Säule gebunden und aufgereinigt werden.

Zur Durchführung wurden die Zellen zunächst in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aufgenommen und bei 5.400 rpm für 5 min abzentrifugiert. Nach dem Abpipettieren und Einfrieren des Überstandes bei -80°C, wurde das Zellpellet in 350 µl RLT-Puffer (+ 1% β-Mercaptoethanol) gelöst und gevortext. Die Zellsuspension wurde in lila Tubes überführt und bei 13.200 rpm für 1 min zentrifugiert. Danach wurde zum Eluat 350 µl 70% Ethanol zugegeben. Nach Resuspension mit der Pipette, folgte der Transfer in die rosa Säulen und ein Zentrifugations-Schritt bei 10.000 rpm für 15 s, um die RNA an die Säule zu binden. Die Reinigung der RNA wurde durch Verwendung mehrerer Waschschriffe vollzogen, wobei einmal mit 700 µl RW1-Waschpuffer

und zweimal mit 500 µl RPE-Waschpuffer gewaschen wurde. Dazwischen wurde jeweils bei 10.000 rpm für 15 s bzw. beim letzten Waschschrift mit RPE für 2 min, zentrifugiert. Die Eluierung der Total-RNA erfolgte dadurch, dass die Säulen auf neue 1,5 ml Eppendorf-Gefäße transferiert und die RNA mit 35 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min eluiert wurde. Direkt im Anschluss wurde die RNA-Konzentration im Photometer bestimmt (s. 3.6.2) und in cDNA umgeschrieben (s. 3.6.3) bzw. bei -80°C eingefroren.

3.6.2 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Nukleinsäure-Konzentrationen in einer Probe können mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden, da diese ein Absorptionsmaximum bei 260 nm haben.

Zur Ermittlung von DNA- und RNA Konzentrationen wurden jeweils 2 µl im NanoDrop Spectrophotometer in einer Doppelbestimmung vermessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass als Referenz das Lösungsmittel verwendet wurde, in dem die RNA bzw. DNA gelöst war.

3.6.3 Umschreibung von RNA in cDNA

Das Enzym Reverse Transkriptase erlaubt eine Umschreibung von RNA in cDNA und synthetisiert dabei unter Verwendung von Desoxy-Nukleotiden dsDNA. Für diesen Vorgang werden kurze Primer mit zufälliger Sequenz und Primer mit Oligo-dT Sequenz benötigt, die sich an die RNA anlagern und als Start-Sequenzen für die Reverse Transkriptase dienen.

Da der *QuantiTect Reverse Transcription Kit* der Firma QIAGEN einen vorgeschalteten DNase-Verdau zur Eliminierung von möglicherweise vorhandener genomischer DNA beinhaltet, wurde dieser zur Umschreibung von Total-RNA verwendet. In allen Fällen wurde eine Negativ-Umschreibe-Kontrolle mitgeführt, die alle Komponenten (auch RNA), außer der Reversen Transkriptase, enthielt.

500 ng RNA wurden in 12 µl H₂O aufgenommen und nach Zugabe von 2 µl *gDNA Wipeout Buffer* (DNase-Schritt) für 4 min bei 42°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Für die Umschreibung wurden folgende Komponenten hinzugefügt und bei 42°C für 25 min inkubiert:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
<i>Quantiscript Reverse Transcriptase</i>	1 µl	-
<i>Quantiscript RT Buffer</i> [5x]	4 µl	[1x]
<i>RT Primer Mix</i>	1 µl	-

Tabelle 16: Komponenten für die RT Reaktion.

Die Reverse Transkriptase wurde durch Erhitzen auf 95°C für 3 min inaktiviert und die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.6.4 Quantitative *Realtime* PCR (qRT-PCR)

Die Methode der qRT-PCR bietet im Gegensatz zur konventionellen PCR (s. 3.6.7), die Möglichkeit der Quantifizierung von PCR-Produkten. Dies bedeutet, dass während der Amplifikation im *Light Cycler* die Kopienzahl von PCR-Produkten ermittelt werden kann. Voraussetzung dafür ist der Einsatz von, für das jeweils zu untersuchende Gen, spezifischen Primern (s. 3.2.8) und Hybridisierungssonden (s. 3.2.9).

Die qRT-PCR-Systeme sind in der Lage kontinuierliche Fluoreszenzsignale zu detektieren, die mit der PCR-Produktbildung durch die Taq-Polymerase einhergehen. Verwendet man den Cyaninfluoreszenzfarbstoff *Sybr Green I*, so lagert sich dieser an dsDNA an. Je mehr PCR-Produkt vorhanden ist, desto größer ist die Fluoreszenzintensität (s. Abbildung 10).

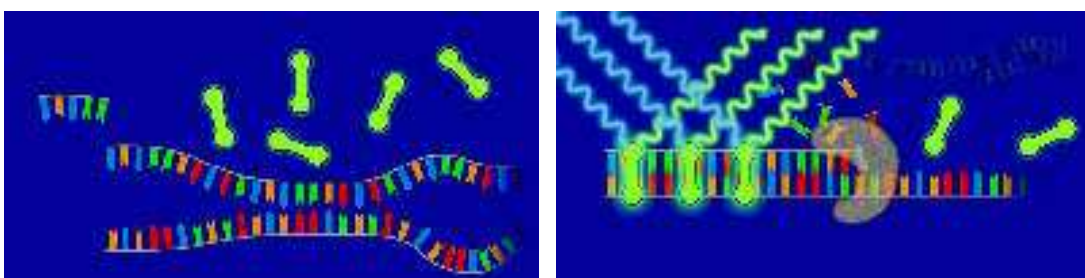


Abbildung 10: *Sybr Green I* Prinzip bei der qRT-PCR (Bild entnommen von der Internetseite www.pcr.at).

Auf eine etwas andere Weise als *Sybr Green I*, funktionieren Hybridisierungssonden. Jeweils zwei verschiedene Sonden sind notwendig: die erste Sonde ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert, die zweite mit LC Red 640. Beide sind spezifisch für ein bestimmtes PCR-Produkt und lagern sich im Abstand von ein bis zwei Basenpaaren an dieses an. Der zweite Farbstoff kann Licht nur emittieren, wenn er

durch den ersten Farbstoff angeregt wird. Dieser Vorgang wird als *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) bezeichnet und setzt voraus, dass beide Sonden direkt nebeneinander gebunden haben (s. Abbildung 11). Dadurch ist es möglich, die Menge eines PCR-Produktes nach jedem Zyklus zu quantifizieren. Ungebundene Sonden diffundieren frei in der Lösung und geben aufgrund der fehlenden räumlichen Nähe ein deutlich schwächeres Signal.

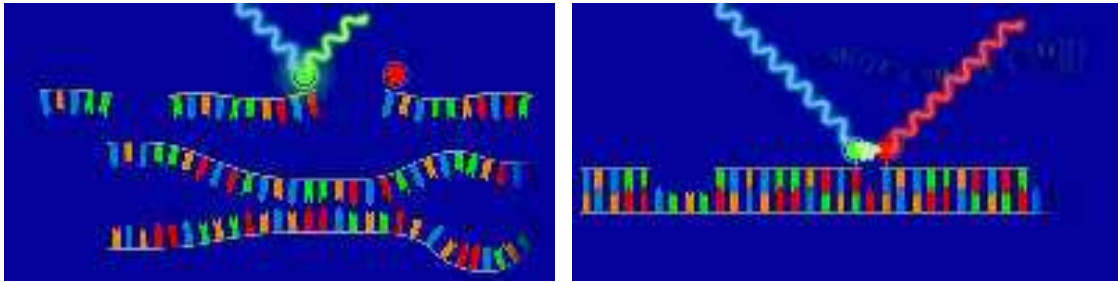


Abbildung 11: Funktionsweise von Hybridisierungssonden bei der *Light Cycler* PCR (Bild entnommen von der Internetseite www.pcr.at).

Alle PCRs, bei denen Hybridisierungssonden eingesetzt wurden, wurden mit dem *Light Cycler FastStart DNA Master HybrProbe Kit* der Firma Roche durchgeführt. Dieser enthält auch die Taq-Polymerase (1a), die vor ihrer Verwendung mit 60 µl Reaktionspuffer (1b) versetzt wurde.

In den Kapillaren wurden jeweils 18 µl Mastermix (s. Tabelle 17) mit 2 µl cDNA oder 2 µl Wasser (Negativkontrolle) gemischt.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O (PCR-grade)	11,6 µl	-
MgCl ₂ [25 mM]	2,4 µl	[4 mM] ^(*)
je Primer [5 µM]	0,5 µl	[125 nM]
je Sonde [3 µM]	0,5 µl	[75 nM]
Taq-Polymerase-Mix [10x]	2,0 µl	[1x]

Tabelle 17: Mastermix für die qRT-PCR im *Light Cycler*.
 (*) 3 mM durch das MgCl₂ und 1 mM durch den Taq-Polymerase-Mix.

Die Kapillaren wurden bei 2.000 rpm für 5 s zentrifugiert und in das *Light Cycler* Karussell gesetzt. Anschließend lief die PCR unter folgenden Bedingungen ab:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95°C	10 min
Amplifikation	45-55	95°C	9 s
		54°C	15 s
		72°C	20 s
Kühlen	1	40°C	5 s

Tabelle 18: PCR-Bedingungen für die qRT-PCR mit Hybridisierungssonden.

3.6.5 Normalisierung gegen das *h-ALAS Housekeeping-Gen*

Das Gen, welches für die *humane δ-Aminolävulinatsynthase (h-ALAS)* codiert, ist ein so genanntes *Housekeeping-Gen*. Damit ist gemeint, dass seine Expression im wesentlichen konstant bleibt und nicht durch äußere Einflüsse verändert wird.

Zur Amplifikation von *h-Alas* wurden jeweils 18 µl Mastermix (s. Tabelle 19) mit 2 µl cDNA gemischt:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O (PCR-grade)	11,6 µl	-
MgCl ₂ [25 mM]	2,4 µl	[4 mM] (*)
<i>h-ALAS</i> Detection Mix [10x]	2,0 µl	[1x]
Taq-Polymerase-Mix [10x]	2,0 µl	[1x]

Tabelle 19: Mastermix für das "*LightCycler® h-ALAS Housekeeping Gene Set*". Alternativ hierzu konnten nach Bekanntgabe der *h-Alas* Primer- (s. 3.2.8) und SONDENSEQUENZEN (s. 3.2.9) diese einzeln bei der Firma TIB MOLBIOL bestellt und je 0,5 µl gemischt werden. (*) 3 mM durch das MgCl₂ und 1 mM durch den Taq-Polymerase-Mix.

Die qRT-PCR lief unter nachstehenden Bedingungen ab:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95°C	10 min
Amplifikation	45	95°C	15 s
		55°C	15 s
		72°C	15 s
Kühlen	1	40°C	5 s

Tabelle 20: PCR-Programm für *h-Alas*.

Nachdem die *Crossing Points* (CP) von *h-ALAS* mit Hilfe des *Light Cyclers* ermittelt waren, wurden diese mit den CP-Werten des zu untersuchenden Gens verrechnet (Normalisierung). Der *Crossing-Point* ist definiert als die Zyklenzahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes signifikant vom Hintergrundsignal abhebt. Somit lässt sich mit Hilfe der *Crossing-Points* eine vergleichende quantitative Aussage über die Ausgangs-DNA Menge in einer Probe machen.

Die Normalisierung unter Zuhilfenahme von *Crossing-Points* geschah, unter der Annahme einer maximalen Amplifikationseffizienz, mit folgender Formel (Johnson *et al.*, 2000; Krauter *et al.*, 2003):

$$\text{Normalisierter Wert} = 2^{(CP \text{ h-ALAS} - CP \text{ Zielgen})}$$

Anschließend wurde der normalisierte Wert der Kontrolle als 100% festgelegt und die anderen Werte ins Verhältnis dazu gesetzt (Relativierung). Bei RNAi Experimenten war dies der Ansatz, bei dem die Zellen ohne siRNA elektroporiert wurden. Derart ließ sich ermitteln, ob ein ausgesuchtes Gen unter einer bestimmten experimentellen Bedingung schwächer oder stärker exprimiert war.

3.6.6 Schmelzkurvenanalyse

Der Einsatz von Hybridisierungssonden eignet sich auch, um Einzelbasen-Polymorphismen (SNPs) zu detektieren (Gibson, 2006). Dazu wird nach der PCR-Amplifikation eine so genannte Schmelzkurve angeschlossen, bei der die Temperatur kontinuierlich in 0,1°C - 0,2°C Schritten pro Sekunde von 40°C auf 85°C erhöht und

stetig das Fluoreszenzsignal gemessen wird. Da eine der beiden Sonden (= Detektor) genau im Bereich der Punktmutation an die Ziel-DNA bindet, schmilzt diese bei Vorhandensein einer Mutation aufgrund einer Fehlbasenpaarung bereits bei niedrigerer Temperatur im Vergleich zu einer perfekt passenden Sonde. Handelt es sich um eine heterozygote Person, so erhält man zwei Peaks, einen bei niedrigerer Temperatur (Schmelzpunkt des „mutanten“ Allels) und einen bei höherer Temperatur (Schmelzpunkt des „Wildtyp“ Allels).

Die *Light Cycler* PCR wurde, wenn nicht anders angegeben, mit einer MgCl₂-Konzentration von 3 mM nach folgendem Schema pipettiert:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O (PCR-grade)	13,4 µl	-
MgCl ₂ [25 mM]	1,6 µl	[3 mM] ^(*)
je Primer [5 µM]	0,5 µl	[125 nM]
je Sonde [3 µM]	0,5 µl	[75 nM]
Taq-Polymerase-Mix [10x]	2,0 µl	[1x]
DNA	1µl	[n.d.]

Tabelle 21: PCR-Mix für Schmelzkurvenanalyse.
 (*) 2 mM durch das MgCl₂ und 1 mM durch den Taq-Polymerase-Mix.

Für die Schmelzkurvenanalyse eigneten sich folgende Bedingungen am besten:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95°C	10 min
Amplifikation	50-60	95°C	9 s
		variabel (ca. 55°C)	15 s
		72°C	20 s
Schmelzkurve	1	95°C	30 s
		40°C	40 s
		85°C	0,1°C/s
Kühlen	1	40°C	5 s

Tabelle 22: PCR-Bedingungen zur Schmelzkurvenanalyse.

3.6.7 Konventionelle PCR

Zur Amplifikation von DNA mittels konventioneller PCR wurde die Polymerase der Firma Peqlab verwendet. Die PCR wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Puffer [10x]	5 µl	[1x]
MgCl ₂ [25 mM]	3 µl	[3,5 mM] ^(*)
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl	[200 µM jedes Nt]
je Primer [5 µM]	1 µl	[0,1 µM]
Peqlab-Polymerase [5U/µl]	0,5 µl	[2,5 U]
humane cDNA	2 µl	[n.d.]
H ₂ O	36,5 µl	-

Tabelle 23: PCR-Mix. Als Ausgangs-DNA diente cDNA, die durch Reverse Transkription aus humaner RNA hergestellt wurde (s. 3.6.3). ^(*) 1,5 mM durch das MgCl₂ und 2 mM durch den Puffer.

In nachstehender Tabelle sind die Bedingungen für die konventionelle PCR wiedergegeben:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	94°C	2 min
Amplifikation	40	94°C	15 s
		variabel	30 s
		72°C	30 s
Finale Elongation	1	72°C	5 min
Kühlen	1	4°C	<i>hold</i>

Tabelle 24: PCR-Bedingungen.

Ein Aliquot der PCR-Produkte wurde zur Überprüfung ihrer Größen im Agarosegel aufgetrennt (s. 3.6.8). Die Berechnung der erwarteten Produktlängen erfolgte durch Ermittlung der Hybridisierungspositionen der beiden Primer durch Datenbankabfrage bei NCBI.

3.6.8 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld auftrennen, wobei DNA aufgrund ihrer negativen Ladung zum Pluspol wandert. Kleinere DNA-Stücke gelangen schneller durch die feinmaschigen Poren des Agarosegels als größere.

In allen Fällen wurde ein 1%-iges Agarosegel hergestellt: Dazu wurde 0,5 g Agarose mit 5 ml 10x TAE-Puffer und 45 ml H₂O gemischt und in der Mikrowelle für 1 min bei 600 Watt aufgekocht. Nach einer 5-minütigen Abkühlphase wurde 5 µl Gelstar bzw. 5 µl Ethidiumbromid dazugegeben und das flüssige Gel zur Auspolymerisation in die vorbereitete Kammer gegossen. Um das Gel mit einem Aliquot der Probe zu beladen, wurden 9 µl Probe mit 1 µl *Blue-Juice* versetzt. Die Amplifikationslänge wurde durch Auftragen von 5 µl 100 bp DNA-Marker überprüft. Nach 45 min bei 120 V erfolgte die Auswertung mit dem Gel-Dokumentationssystem.

3.6.9 Sequenzierung

Sequenziert wurde mit dem *Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer*. Hierfür wurde das PCR-Produkt auf einem Agarosegel hinsichtlich der zu erwartenden Größe analysiert (s. 3.6.8) und aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte durch einen Verdau mit ExoI und SAP, wodurch ssDNA abgebaut und nicht in DNA eingebaute Nukleotide aufbereitet wurden. Es wurde 10 µl PCR-Produkt mit 1,5 µl H₂O, 0,1 µl ExoI und 0,4 µl SAP gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der beiden Enzyme erfolgte durch Erhitzen auf 80°C für 15 min.

Für die Kettenabbruchreaktion mit Didesoxynukleotiden (Sanger *et al.*, 1977) wurden nachstehende Komponenten gemischt:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
PCR-Produkt	5 µl	-
<i>Big Dye</i> Puffer [5x]	4 µl	[1x]
Primer [5 µM]	1 µl	[250 nM]
<i>Big Dye</i> Enzym	0,5 µl	-
H ₂ O	9,5 µl	-

Tabelle 25: Mix für Sequenzierreaktion.

Die Sequenzierreaktion erfolgte mit diesen Bedingungen:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	96°C	30 s
Sequenzierreaktion	30	96°C	10 s
		50°C	5 s
		60°C	3 min

Tabelle 26: Sequenzierbedingungen.

Nach der Kettenabbruchreaktion wurde zu den 20 µl Sequenziermix 2 µl Natriumacetat (3 M, pH 6,8) und 50 µl Ethanol zugefügt und 30 min bei 13.200 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die derart gefällte DNA wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und zwischendurch für 10 min bei 13.200 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 5 min in der Speedvac getrocknet, in 11 µl Formamid aufgenommen, in eine 96-Well-Platte überführt und für 1 h in den Sequenzierautomat gestellt. Die Auswertung erfolgte mit der *Sequencing Analysis Software* von Applied Biosystems.

3.6.10 MALDI-TOF-MS zur SNP-Analyse

MALDI ist die Abkürzung für *matrix-assisted laser desorption ionization* und steht für ein Laser-gestütztes Verfahren zur Ionisation von Molekülen (Koy *et al.*, 2003). Es erwies sich seit seiner Entwicklung als besonders effektiv in Kombination mit der Massenspektrometrie (MS).

Bei der MALDI-Methode wird die Probe in einer kristallinen Matrix integriert und für wenige Nanosekunden mit kurzwelligem Laserlicht bestrahlt. Die elektronische Anregungsenergie führt zu einer lokalen Auflösung der Festkörperoberfläche (Matrix + Probe), wodurch die Moleküle in die Gasphase übertreten. Eine Elektrode, die sich in geringem Abstand gegenüber der Probe befindet, erzeugt ein elektrostatisches Feld. Je nach Polarität der Elektrode werden positive oder negative Ionen von der Probenoberfläche in Richtung des Analysators beschleunigt. Für MALDI-Untersuchungen werden Flugzeitmassenspektrometer (TOF, *time of flight*) als Analysatoren benutzt. Die Massenbestimmung erfolgt über die genaue Messung der Zeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Probe bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Diese Zeit hängt vom Verhältnis aus der Masse (m) und der Ladungszahl (z) ab. Dadurch ist es möglich, die Molekülmasse von ionisierten Biomolekülen (DNA und Proteine) hochgenau

zu ermitteln. Somit eignet sich der Einsatz von MALDI-MS auch zur SNP-Analyse, da der Austausch eines Nukleotides, nach Ionisation eines entsprechenden DNA-Produktes, detektiert werden kann (Sauer, 2006).

Mittels konventioneller PCR (s. 3.6.7) wurden PCR-Produkte in der Größenordnung von etwa 150 bp hergestellt und auf einem Agarosegel überprüft (s. 3.6.8). Für den Verdau der bei der PCR verwendeten Primer wurden je 7 µl PCR-Produkt zusammen mit 0,4 µl SAP und 1,6 µl SAP-Puffer in eine 96-Well Platte pipettiert und bei 37°C für 45 min und bei 90°C für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte das so genannte *Primer Extension*, wofür die in Tabelle 27 aufgelisteten Komponenten gemischt wurden:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
verdautes PCR-Produkt	9 µl	-
Tris-HCl Puffer [25x]	0,9 µl	[1,5x]
MgCl ₂ [60 mM]	0,48 µl	[2 mM]
ddNTP 1 [60 nM]	1 µl	[4 nM]
ddNTP 2 [60 nM]	1 µl	[4 nM]
SNP-Primer [150 pmol/µl]	1 µl	[10 pmol/µl]
Thermipolymerase [5 U/µl]	0,3 µl	[1,5 U]
H ₂ O	1,32 µl	-

Tabelle 27: *Primer Extension* Reaktion.

Das *Primer Extension* wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	94°C	1 min
Primer Extension	35	94°C	10 s
		54°C	1 min
Finale Reaktion	1	72°C	1 min

Tabelle 28: *Primer Extension* Programm.

Nach dem *Primer Extension* wurden 15 µl Produkt mit 4 µl Bindepuffer in einer 96-Well Streptavidinplatte gemischt und für 30 min inkubiert (s. 3.2.2, *Genostrep* 96 Kit). Da der für das *Primer Extension* verwendete Primer Biotin-markiert war und bei der Reaktion ddNTPs verwendet worden waren, konnte der um ein Nukleotid verlängerte SNP-Primer (s. 3.2.8) an die Platte gebunden werden. Nach je zweimaligem Wa-

schen mit 40 µl Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 wurde 20 µl Elutionspuffer zugegeben und die Platte für 15 min unter die UV-Lampe gestellt. Durch die Bestrahlung bei 366 nm wurde der Primer von der Platte abgespalten und 1 µl konnte auf einen Anchor-Chip (auf vorher 1 µl getrocknete Matrix) pipettiert und am MALDI-TOF analysiert werden. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie (Prof. Michael Zimmer, MTA Gunnar-Ingi Kristjansson) durchgeführt.

3.6.11 Microarray-Analysen

DNA-Microarrays erfreuen sich zunehmender Beliebtheit, da mit ihrer Hilfe diejenigen Gene ermittelt werden können, die differentiell exprimiert sind. Die Analysen werden dabei mit speziellen Objektträgern durchgeführt, auf denen DNA-Oligomere mit einer bestimmten Sequenz aufgebracht wurden, die für jedes Gen charakteristisch sind (DNA-Chips). Nach Hybridisierung mit einer Fluoreszenzmarkierten cDNA, die durch Umschreibung von Gesamt-RNA aus der zu untersuchenden Probe hergestellt wird, können die Signale mit einem Laser detektiert und mittels Computer-Software statistisch ausgewertet werden. Im Idealfall kann so ermittelt werden, welche der ca. 40.000 Gene des Menschen eine veränderte Expression aufweisen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde pro Ansatz aus 5×10^6 DCs die RNA isoliert (s. 3.6.1), die Qualität am Bioanalyzer kontrolliert (gemäß Protokoll für Agilent RNA 6000 Nano Kit, www.agilent.com) und 2 µg in mit Biotin-markierte cDNA umgeschrieben (*One-Cycle / Two-Cycle Labeling Kit*, Affymetrix, http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx).

Ausgehend von cDNA wurde mittels *in vitro* Transkription cRNA synthetisiert. Nach Fragmentierung von 20 µg cRNA erfolgte die Hybridisierung auf Affimetrix Chips (HG-U133 Plus 2.0) für 16 h bei 45°C und der Nachweis mit Streptavidin-Phycoerythrin Färbelösung. Die Genchips wurden mit dem GeneChip Scanner 3000 eingelesen.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Bioconductor Paket (www.bioconductor.org) unter dem Statistikprogramm R (www.r-project.org) verwendet (Gentleman *et al.*, 2005). Nach Normalisierung der Daten mit *variance stabilization* (VSN; Huber *et al.*, 2002) wurden mit Limma (*Linear Models for Mic-*

roarray Analysis) die differentiell exprimierten Gene, unter Angabe eines T- und p-Wertes, ermittelt (Smyth *et al.*, 2003).

Die experimentelle Durchführung und die Auswertung der Daten erfolgte in enger Kooperation mit dem Labor für Microarray Anwendungen (Dr. Susanne Kneitz) der Universität Würzburg.

3.7 Arbeitsdiagramm für RNAi-Experimente

Zur Veranschaulichung der experimentellen Arbeitsabläufe für die RNAi Experimente mit DCs ist folgende Grafik gezeigt. Das Arbeitsdiagramm gibt einen Überblick darüber, wie DCs generiert und mit siRNA transfiziert wurden, um anschließend entsprechende Expressionsstudien durchzuführen.

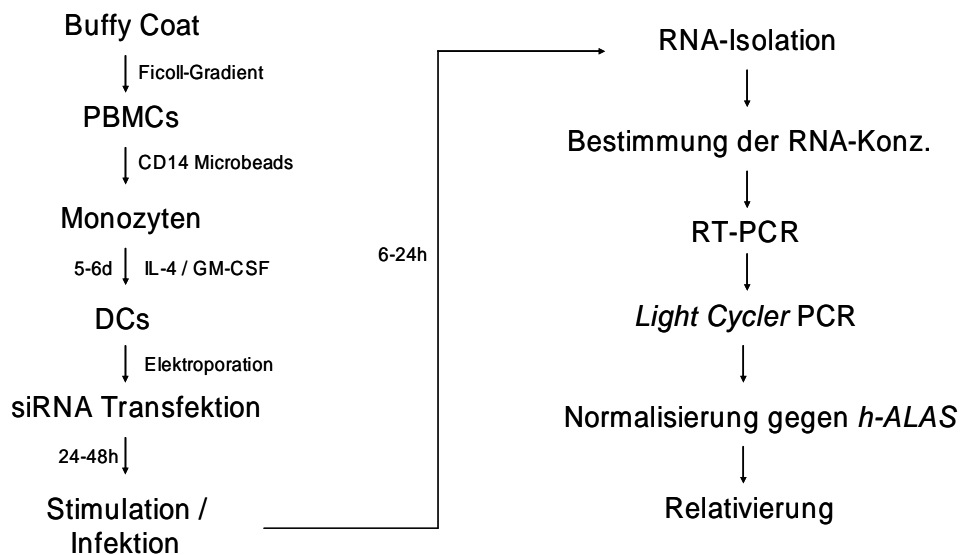


Abbildung 12: Arbeitsdiagramm für RNAi-Experimente.

3.8 Arbeiten mit Proteinen

3.8.1 ELISA

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von molekularen Substanzen. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an einen nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. In dieser Dissertation wurden ELISAs für TNF- α und IL-12 der Firma *Biosource* verwendet (s. 3.2.2). Die Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Puffer finden sich im Abschnitt 3.2.4.

Der primäre Antikörper wurde mit dem *Coating* Puffer gemischt (TNF- α : 2 $\mu\text{g/ml}$, IL-12: 1 $\mu\text{g/ml}$), je 100 μl in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und für 18 h bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zweimal mit 200 μl Waschpuffer gewaschen und mit 300 μl Assay Puffer für 1 h bei RT geblockt. In dieser Zeit wurde eine Verdünnungsreihe des Standards mit Assay Puffer hergestellt (1 ng/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,625 pg/ml). Es wurden je 100 μl Probe, Standard und Assay Puffer (Negativkontrolle) pro Well pipettiert und sofort 50 μl des Biotin-markierten Antikörpers (TNF- α : 320 ng/ml, IL-12: 160 ng/ml) zugegeben. Nach 2 h Schütteln bei RT mit 700 rpm wurde zweimal gewaschen. Danach wurden 100 μl des HRP-markierten Antikörpers zugegeben (TNF- α : 1/625 Verdünnung, IL-12: 1/2.500 Verdünnung in Assay Puffer) und für 30 min geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen wurde 100 μl TMB-Substrat pro Well pipettiert und für ca. 30 min im Dunkeln geschüttelt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 μl 1,8 N Schwefelsäure abgestoppt. Anschließend wurde im ELISA Reader bei 451 nm (Referenzwellenlänge: 620 nm) die Extinktion gemessen und mit Hilfe der Standards die Konzentrationen der einzelnen Proben in Microsoft Excel ermittelt. In allen Fällen wurde eine Doppelbestimmung gemacht und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet (s. 3.9).

3.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in 40 μl SDS-Ladepuffer (+ 10% β -Mercaptoethanol) aufgenommen und für 5 min aufgekocht (s. 3.2.4). Die Auftrennung der Proteine fand in 6%-igen Sammelgelen und 12%-igen Trenngelen statt. Hierfür wurden die in

Tabelle 29 aufgelisteten Komponenten gemischt (erst Trenn- dann Sammelgel) und zwischen 2 Glasplatten mit 0,75 mm *Spacern* gegossen.

Lösung	Trenngel (12%-ig)	Sammelgel (6%-ig)
H ₂ O	4,63 ml	6,7 ml
3 M Tris, pH 8,8	1,25 ml	-
1 M Tris, pH 6,8	-	1,25 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
Polyacrylamid	3,96 ml	1,95 ml
10% APS	50 µl	50 µl
Temed	10 µl	10 µl

Tabelle 29: Pipettierschema zur Herstellung von 12%-igen und 6%-igen Polyacrylamidgelen.

Es wurden 5 µl Marker bzw. 20 µl Probe aufgetragen und folgende Laufbedingungen gewählt: 30 min, 80V und 45 min, 120V.

3.8.3 Western Blot

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrocellulose-Membran wurde mit einem *Semi-Dry-Blotter* durchgeführt. Zunächst wurde die Membran und die *Whatman*-Papiere zurechtgeschnitten (7,5 x 6 cm) und die Membran in Wasser bzw. die *Whatman*-Papiere in Transferpuffer befeuchtet. Der Transfer fand nach Aufbau des Blots für 30 min bei 160 mA statt. Die Effizienz des Transfers konnte mit Hilfe einer Ponceau-Lösung (s. 3.2.4) überprüft werden. Diese wurde für 2 min auf die Membran gegeben und anschließend so lange mit TTBS gespült bis einzelne Proteinbanden zu sehen waren. Durch längeres Spülen konnte die Ponceau-Färbung vollständig runtergespült und die Membran zur Antikörper- Detektion weiterverwendet werden.

Die Membran wurde in TTBS (+ 1% BSA) für 30 min bei RT geblockt, einmal mit TTBS für 15 min gewaschen und dann der primäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung üN bei 4°C inkubiert (s. 3.2.11).

Am nächsten Tag wurde einmal mit TTBS für 15 min gewaschen, einmal für 30 min mit TTBS (+ 1% BSA) geblockt und erneut einmal mit TTBS für 15 min gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde für 1 h bei RT zugegeben und die Membran danach dreimal für 15 min mit TTBS gewaschen.

Erfolgte die Detektion mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase, so wurde zunächst eine Tablette des Substrates (enthält BCIP und NBT) in 10 ml Wasser gelöst und davon 1 ml auf die Membran gegeben, bis ein blauer Farbniederschlag zu sehen war. Die Reaktion konnte durch mehrmaliges Spülen der Membran mit Wasser gestoppt werden.

Für den Nachweis mittels Chemolumineszenz wurde von den beiden ECL-Lösungen je 1 ml Lösung A mit 1 ml Lösung B gemischt und für 2 min auf die Membran gegeben. Diese wurde dann zwischen zwei Folien gelegt. Die Exposition mit dem Röntgenfilm fand, je nach Signalstärke, für verschieden lange Zeitpunkte (2 s – 5 min) statt, bevor dieser in den Entwickler gegeben wurde.

3.9 Statistik

Alle vorliegenden Ergebnisse wurden, wenn nicht anders angegeben, mindestens als $n=3$ produziert. Im Falle der RNAi Experimente wurde in der Regel eine vierfache Wiederholung mit DCs von mindestens zwei unterschiedlichen Spendern gemacht. Das arithmetische Mittel (\bar{x}) von Einzelmessungen und die zugehörige Standardabweichung (s) wurden nach folgenden Formeln in Microsoft Excel berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + \dots + x_i) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$
$$s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

Hinweis:

Für die meisten Experimente wurden DCs aus Monozyten von unterschiedlichen Spendern generiert. Dies hatte zur Folge, dass die Zellen unterschiedlich stark auf einen bestimmten Stimulus, wie z.B. LPS oder Zymosan, reagierten (s.a. Agrawal *et al.*, 2007). Daher ist in der Regel eine repräsentative Grafik von einem experimentellen Ansatz gezeigt, wohingegen eventuell durch siRNA hervorgerufene Reduktionen als Mittelwerte (inklusive Standardabweichung) angegeben sind.

Eine Aussage über die Signifikanz eines Ergebnisses bei den SNP-Analysen wurde durch die Anwendung des Allel-Frequenz-Differenz-Testes getroffen (Löffler *et al.*, 2006). Die Wahrscheinlichkeit von $p < 0.01$ besagte, dass das Ergebnis mit einer Wahrscheinlichkeit von 1% als falsch zu werten ist.

4 Ergebnisse

4.1 Infektion von DCs mit HCMV

4.1.1 Etablierung eines Zellkultursystems zur HCMV-Anzucht

Die Etablierung des Zellkultursystems erfolgte im Institut für Virologie der Universität Würzburg bei Herrn Dr. Benedikt Weißbrich und Frau MTA Barbara Scheiner. Der Großteil der Ergebnisse zur Etablierung des Zellkultursystems sind bereits im Material- und Methodenteil niedergeschrieben und eignet sich als ideale Anleitung zur Anzucht von HCMV (s. 3.3).

Die nachfolgend gezeigten Abbildungen zeigen mikroskopische Aufnahmen von mit dem klinisch relevanten HCMV Stamm TB40E infizierten Fibroblasten (MRC5-Zellen) im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen (s. Abbildung 13).

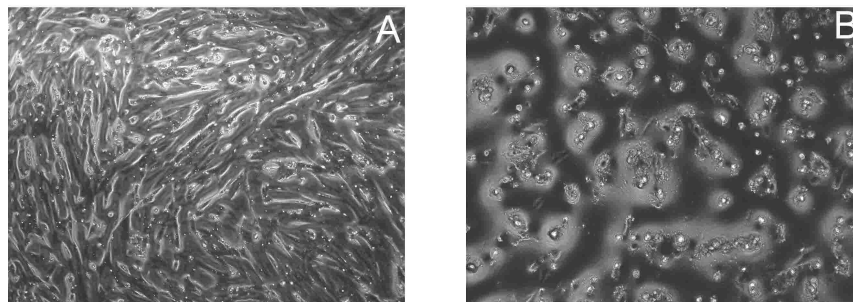


Abbildung 13: Aufnahmen von Fibroblasten (MRC5-Zellen) mit dem Inversen Mikroskop. Im Gegensatz zu den uninfizierten Zellen (A) zeigten die mit TB40E infizierten Zellen bereits nach 24 h einen deutlichen Cytopathischen Effekt (B).

Die erfolgreiche Infektion von MRC5-Zellen wurde nicht nur anhand des Cytopathischen Effektes (CPE) kontrolliert, sondern auch durch Immunfluoreszenzfärbungen. 24 h nach Infektion konnten virale Genprodukte (pp65 und IE) mit spezifischen Antikörpern in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Dies setzte voraus, dass die Zellen vor der Färbung auf Objektträger aufgebracht wurden (s. 3.3.6).

Bei der Gegenüberstellung der beiden Färbemethoden (pp65 und IE Detektion) wurde deutlich, dass sich die IE-Färbung ebenso zum Nachweis von infizierten MRC5-Zellen eignete wie die pp65-Färbung (s. Abbildung 14).

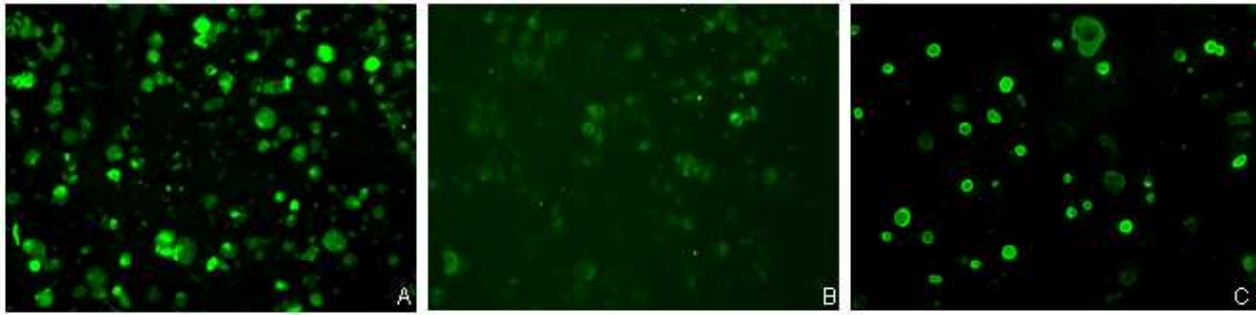


Abbildung 14: A) IE-Färbung, B) Negativkontrolle IE-Färbung, C) pp65-Färbung. (Bemerkung: Negativkontrolle für pp65-Färbung sah genauso aus wie Abbildung B und ist daher nicht gezeigt.)

4.1.2 Kontrolle der Reinheit von Monozyten, DCs und Granulozyten

Durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF lassen sich *in vitro* aus Monozyten große Mengen an DCs generieren (s. 3.5.4). Diese sind dadurch definiert, dass sie in der FACS-Analyse (s. 3.5.7) positiv für die Oberflächenmoleküle CD1a, CD40, CD80 und CD86, sowie negativ für CD14 und CD83 sind.

Zur Generierung von DCs wurde auf frisch abgenommenes Blut oder auf *Buffy Coats* aus der Blutbank in Frankfurt zurückgegriffen. Aus 100 ml frischem Blut konnten ca. 1×10^8 PBMCs (s. 3.5.1) und ca. 1×10^7 CD14-positive Zellen (s. 3.5.3) gewonnen werden, aus 50 ml *Buffy Coat* Blut ca. 5×10^8 PBMCs und ca. 5×10^7 CD14-positive Zellen.

Bei der Isolierung von Monozyten mittels CD14 *Beads* wurde eine Reinheit von ca. 90% erzielt (s. Abbildung 15 A). Die FSC/SSC-Analyse im FACS zeigte, dass es mehrere Zellpopulationen gab, von denen die beiden mit einem *Gate* (R1 + R2) markierten CD14 positiv waren (B). Die übrigen 10% zeigten diesen Marker nicht. Was die anderen Oberflächenmarker betraf, so zeigten die CD14-positiven Zellen keine Expression für CD1a (B) und CD83 (C) und lediglich eine schwache Expression für CD80 (C). CD40 und CD86 waren in etwa gleich stark auf Monozyten (C) und DCs (F) exprimiert.

Die Ausbeute an DCs betrug nach einer Woche Kultivierung etwa 1/3 der eingesetzten Anzahl an Monozyten. Routinemäßig wurden alle paar Wochen die *in vitro* generierten DCs im FACS kontrolliert (s. Abbildung 15 D, E und F). Im Gegensatz zu den Monozyten waren die DCs deutlich positiv für CD1a (E) und CD80 (F), schwach positiv für CD83 (F) und eindeutig negativ für CD14 (E). Die Reinheit der DCs betrug weit über 95%.

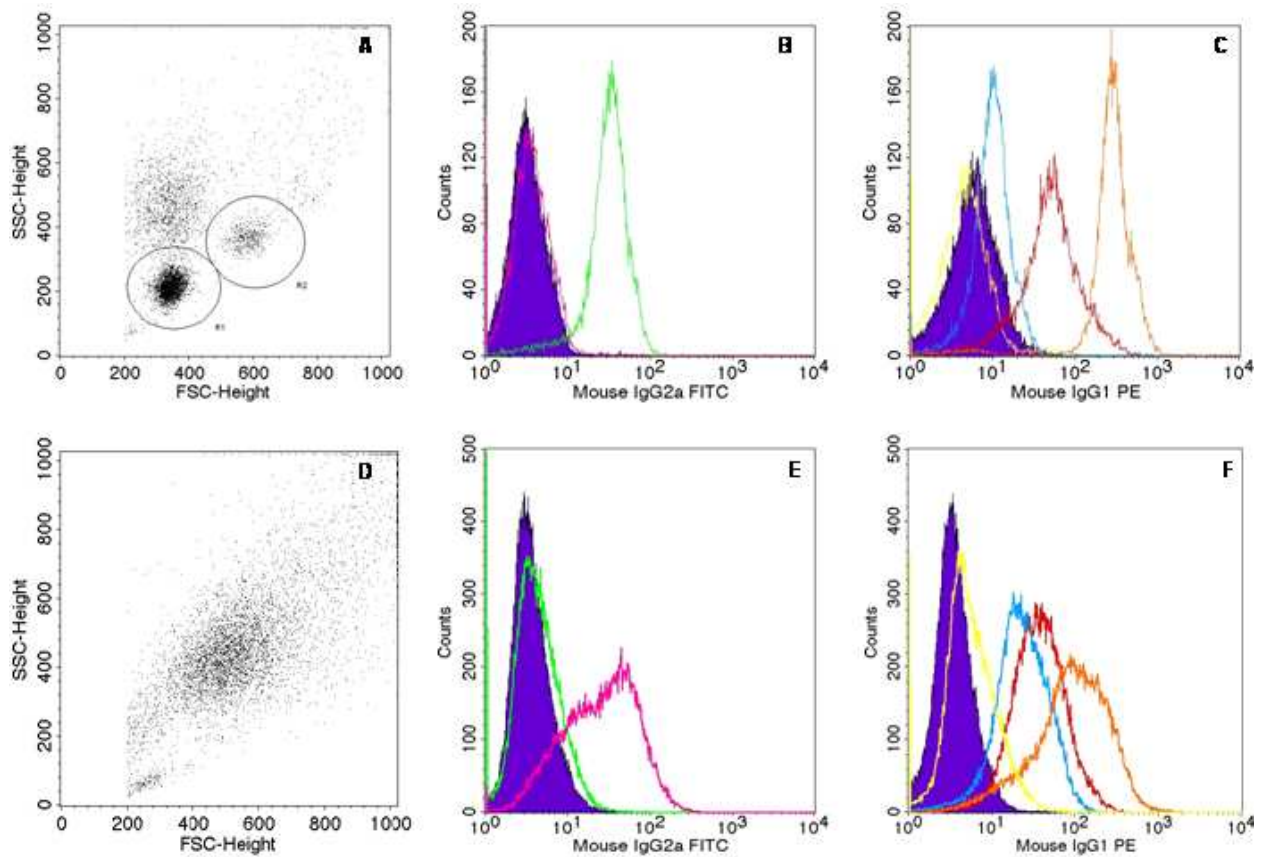


Abbildung 15: FACS Analyse der Oberflächenmarker CD14 (grün), CD1a (pink), CD40 (rot), CD80 (blau), CD83 (gelb) und CD86 (orange) für Monozyten (A, B, C) und DCs (D, E, F).

Granulozyten wurden mit Hilfe eines speziellen Polymorphprep aufgereinigt (s. 3.5.5) und vor ihrer Verwendung für Experimente im FACS analysiert. Als Marker für Granulozyten diente CD66. Es wurde eine Reinheit von <95% erzielt.

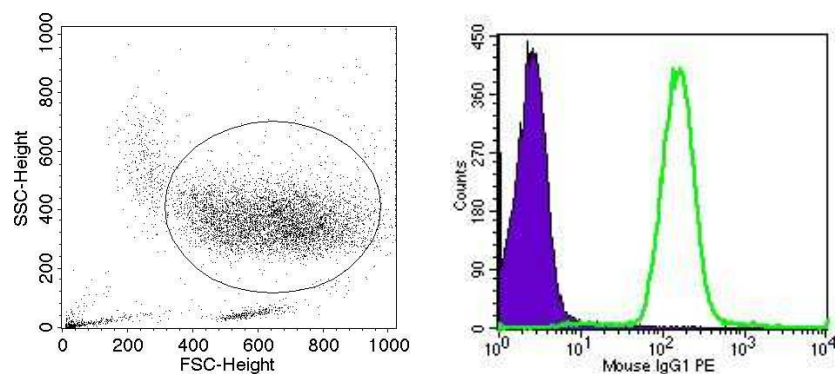


Abbildung 16: Einfachfärbung von über Polymorphprep aufgereinigten Granulozyten mit dem α -CD66 Antikörper.

4.1.3 Ermittlung der HCMV Infektionseffizienz bei DCs

Für eine erfolgreiche Infektion von DCs mit dem HCMV Stamm TB40E musste zuerst eine Viruskonzentrierung durchgeführt werden (s. 3.3.3). Um diesen Schritt zu evaluieren, wurde ein Vergleich zwischen Konzentrat, das vom Institut für Virologie in Tübingen bezogen wurde, und eigens hergestelltem Viruskonzentrat gemacht. Zum Nachweis der erfolgreichen Infektion wurde die IE-Färbemethode auf ihre Funktionalität und Spezifität hin getestet (s. 3.3.6). Die Infektion von DCs mit dem Tübinger Konzentrat ergab eine Infektionseffizienz von ca. 40%, mit dem eigenen Konzentrat von ca. 30% (Daten nicht gezeigt).

Da bislang mit unbekanntem Virusmengen gearbeitet wurde, sollte für die eigentlichen Experimente eine größere Menge an Virus mit bekanntem Titer hergestellt werden. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Virologie der Universität Erlangen (Prof. Michael Mach, Frau MTA Barbara Kropff) wurden Viruskonzentrate von dem HCMV-Stamm TB40E hergestellt (s. 3.3.3). Die Ermittlung des Virustiters (s. 3.3.4) ergab einen Wert von $4,2 \times 10^{11}$ (s. Abbildung 17).

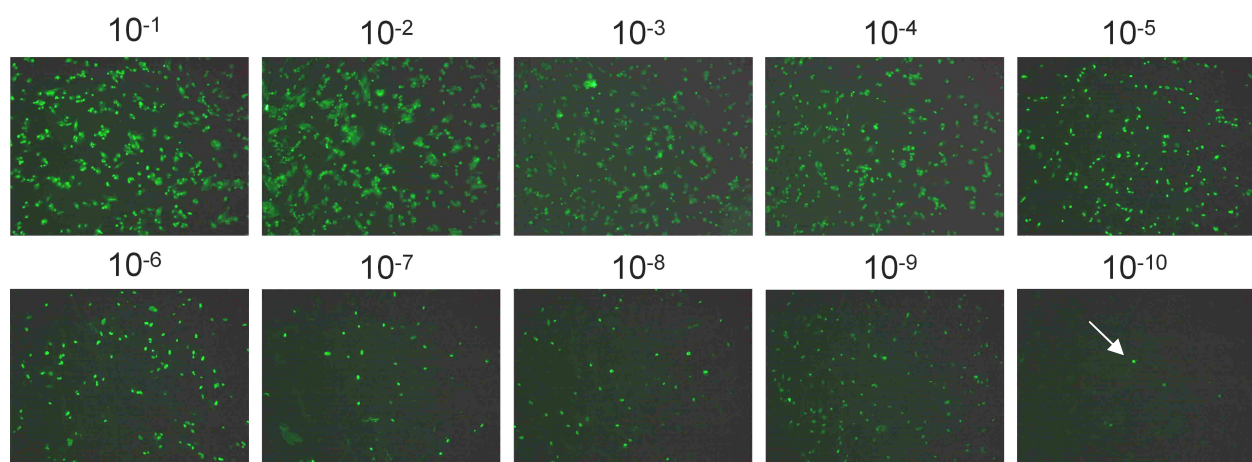


Abbildung 17: Virustiterbestimmung nach Reed und Münch, 1938 für TB40E (s. 3.3.4). Ausgehend von der Stock-Lösung wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe hergestellt und ermittelt, ab welcher Verdünnung nur noch eine einzige Zelle als positiv gewertet werden konnte (weißer Pfeil).

Um auszutesten, wie viel mal mehr Virus im Vergleich zur Zellzahl für eine gute Infektionseffizienz benutzt werden musste, wurden DCs mit einer MOI=10 bzw. MOI=50 infiziert und die jeweilige Infektionseffizienz ermittelt. Dabei zeigte sich, dass mit einer MOI von 50 in ca. 40% der DCs und mit einer MOI von 10 in ca. 30% das virale IE-Protein nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 18).

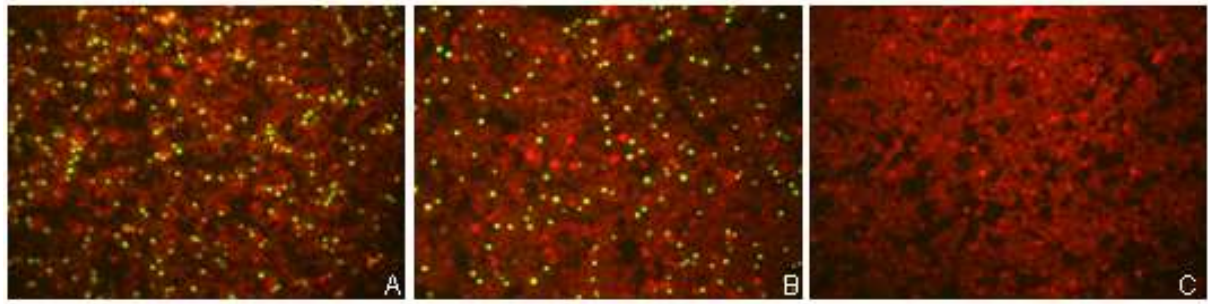


Abbildung 18: IE-Färbung von DCs 24 h nach Infektion mit HCMV TB40E mit einer MOI=50 (A) und MOI=10 (B). In Abbildung C wurde nur Medium zu den DCs gegeben (mock-Infektion).

4.1.4 Zeitabhängige Expressionsanalysen nach Infektion von DCs mit HCMV

Nachdem gezeigt wurde, dass DCs mit dem klinisch relevanten HCMV-Stamm TB40E infiziert werden konnten, sollte als nächstes untersucht werden, wie die Infektion die Expression ausgesuchter Cytokine und Immunrezeptoren in Abhängigkeit der Zeit beeinflusst. Frühere Microarray-Analysen unserer Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass ca. 700 Gene 24 h nach Infektion eine mindestens zweifache differentielle Regulation aufwiesen (Daten unveröffentlicht). Neben zahlreichen Genen, die die Expression von Klasse I Interferonen (*IFN- α* , *IFN- β*) regulieren, zeigten *CXCL10* und *CXCL11* eine knapp 1.000 fache, und somit die stärkste Erhöhung.

Um ein besseres Verständnis darüber zu bekommen, wie diese Gene zeitabhängig reguliert werden, wurden 1×10^6 DCs mit TB40E (MOI=10) infiziert (s. 3.3.5), nach 1-6 h und 24 h die RNA isoliert (s. 3.6.1), in cDNA umgeschrieben (s. 3.6.3) und das Expressionsprofil von *CXCL10*, *CXCL11*, *CCL5*, *IFN- α* , *IFN- β* , *TLR2*, *TLR3* und *DC-SIGN* am *Light Cycler* bestimmt (s. 3.6.4). Für alle Experimente wurde vor der cDNA-Synthese immer eine DNase-Behandlung von 5 min durchgeführt und eine Umschreibekontrolle mitgeführt, die alle Komponenten (auch Total-RNA), mit Ausnahme die Reversen Transkriptase, enthielt.

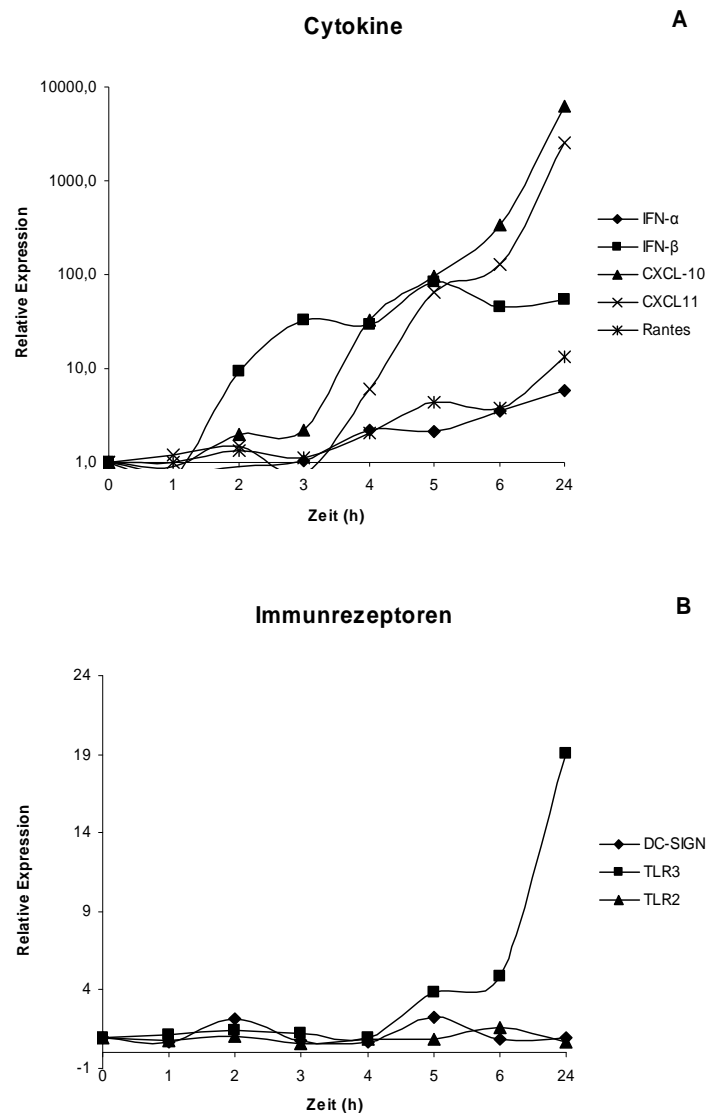


Abbildung 19: Zeitliche Expression (1-6 h, 24 h) ausgesuchter Cytokine (A) und Immunrezeptoren (B) nach Infektion von 1×10^6 DCs mit dem HCMV Stamm TB40E (MOI=10). Die Expressionen wurden mit Hilfe der qRT-PCR ermittelt (s. 3.6.4). Der Verlauf ist repräsentativ für drei verschiedene DC-Spender.

In Übereinstimmung zu den Microarrays wurde für *CXCL10* und *CXCL11* die höchste Expression (1.000fach) aller untersuchten Gene beobachtet. Dabei wurde eine stetige Zunahme der Expression in Abhängigkeit der Zeit erfasst, die allerdings erst 3-4 h nach Infektion einsetzte. Im Gegensatz dazu zeigte *IFN- β* bereits nach 2 h eine 10 fache Erhöhung der Expression.

Was die Expression von *TLR3* betraf, so war *TLR3* nach 24 h am stärksten exprimiert (20 fach), zeigte aber schon nach 5 h eine 4 fache Erhöhung. Für *TLR2* und *DC-SIGN* konnte gezeigt werden, dass durch TB40E die Expression auch 24 h nach Infektion unverändert blieb.

4.2 TLR-Expression von Monozyten, DCs und Granulozyten

4.2.1 Nachweis der Expression von TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 mittels qRT-PCR

Für verschiedene TLRs wurde nachgewiesen, dass diese an der Erkennung von HCMV und *A. fumigatus* beteiligt sind (s. 2.4.2). In einem ersten Experiment wurden verschiedene Leukozyten-Populationen (PBMCs: s. 3.5.1; Monozyten: s. 3.5.3; PMNs: s. 3.5.5 und DCs: s. 3.5.4) isoliert und ihr Expressionsprofil für *TLR2*, *TLR3*, *TLR4* und *TLR9* ermittelt. Folgende Grafiken geben einen Überblick darüber, wie die einzelnen TLRs von den unterschiedlichen Immuneffektorzellen exprimiert wurden. In allen Fällen wurde die TLR Expression auf die Expression von *h-ALAS* bezogen.

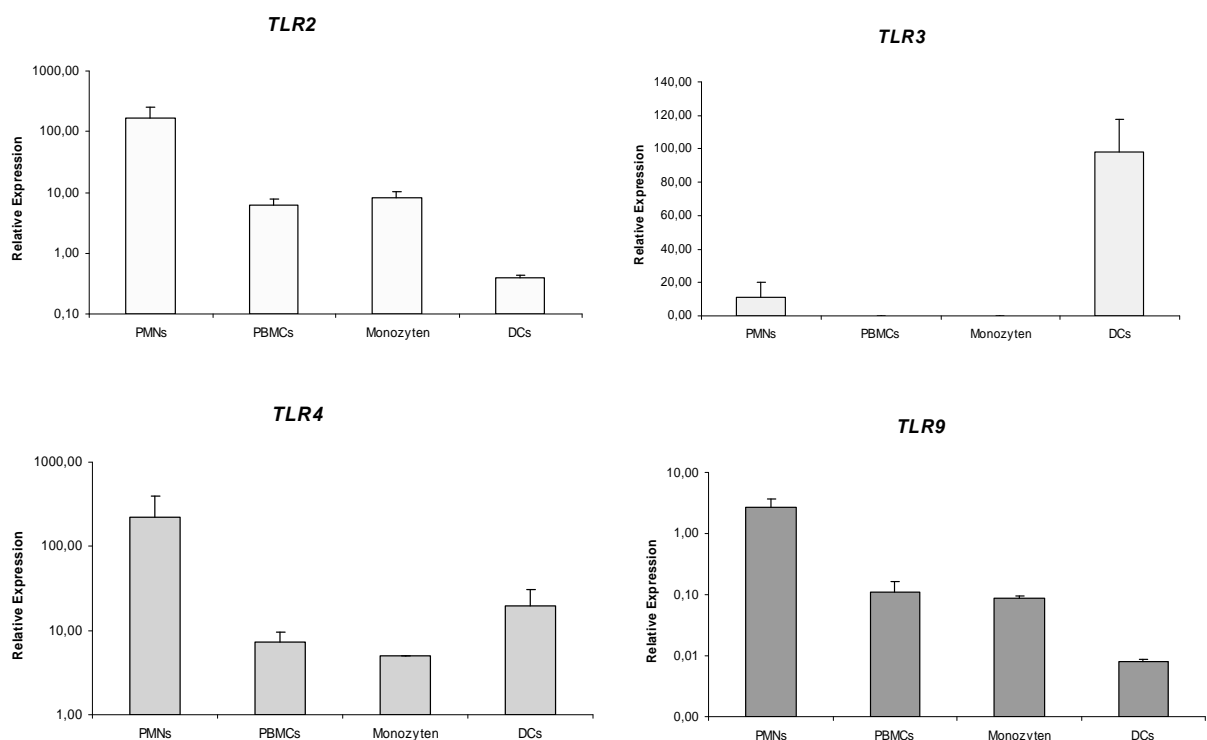


Abbildung 20: Ermittlung des Expressionsprofils von *TLR2*, *TLR3*, *TLR4* und *TLR9* auf PBMCs, Monozyten, PMNs und DCs. Aus je 1×10^6 Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert (s. 3.6.1) und jeweils die gleiche Menge für die RT-PCR eingesetzt (s. 3.6.3). Anschließend erfolgte am *Light Cycler* die Ermittlung der Expression der einzelnen *TLRs* und von *h-Alas* (s. 3.6.4 und 3.6.5). Die Grafiken zeigen einen normalisierten Mittelwert der Expression von zwei unterschiedlichen Spendern.

Bezogen auf die Expression von *h-ALAS* zeigten Granulozyten (PMNs) die stärkste Expression für *TLR2*, *TLR4* und *TLR9*. Im Gegensatz dazu wurde *TLR3* von Granulozyten

nur schwach und von PBMCs und Monozyten überhaupt nicht exprimiert. *In vitro* generierte DCs hingegen zeigten eine auffällig hohe Expression für *TLR3*.

Eine Analyse, bei der die Expression der einzelnen TLRs auf die Expression von Ubiquitin bezogen wurde, hatte ein ähnliches Bild ergeben (Kadowaki *et al.*, 2001).

4.2.2 Nachweis der Expression von TLR2, TLR3 und TLR4 mittels Durchflusszytometrie

Die Analyse zur Lokalisation von TLR2 und TLR4 wurde mit dem Durchflusszytometer durchgeführt. Für diesen Versuchsansatz wurden Monozyten nach CD14-Isolierung (s. 3.5.3) und DCs nach einer Woche in Kultur von denselben Spendern (s. 3.5.4) mit dem TLR2 bzw. TLR4 Antikörper gefärbt und im FACS analysiert (s. 3.5.7). Auch PMNs (s. 3.5.5) wurden in die Analyse miteinbezogen.

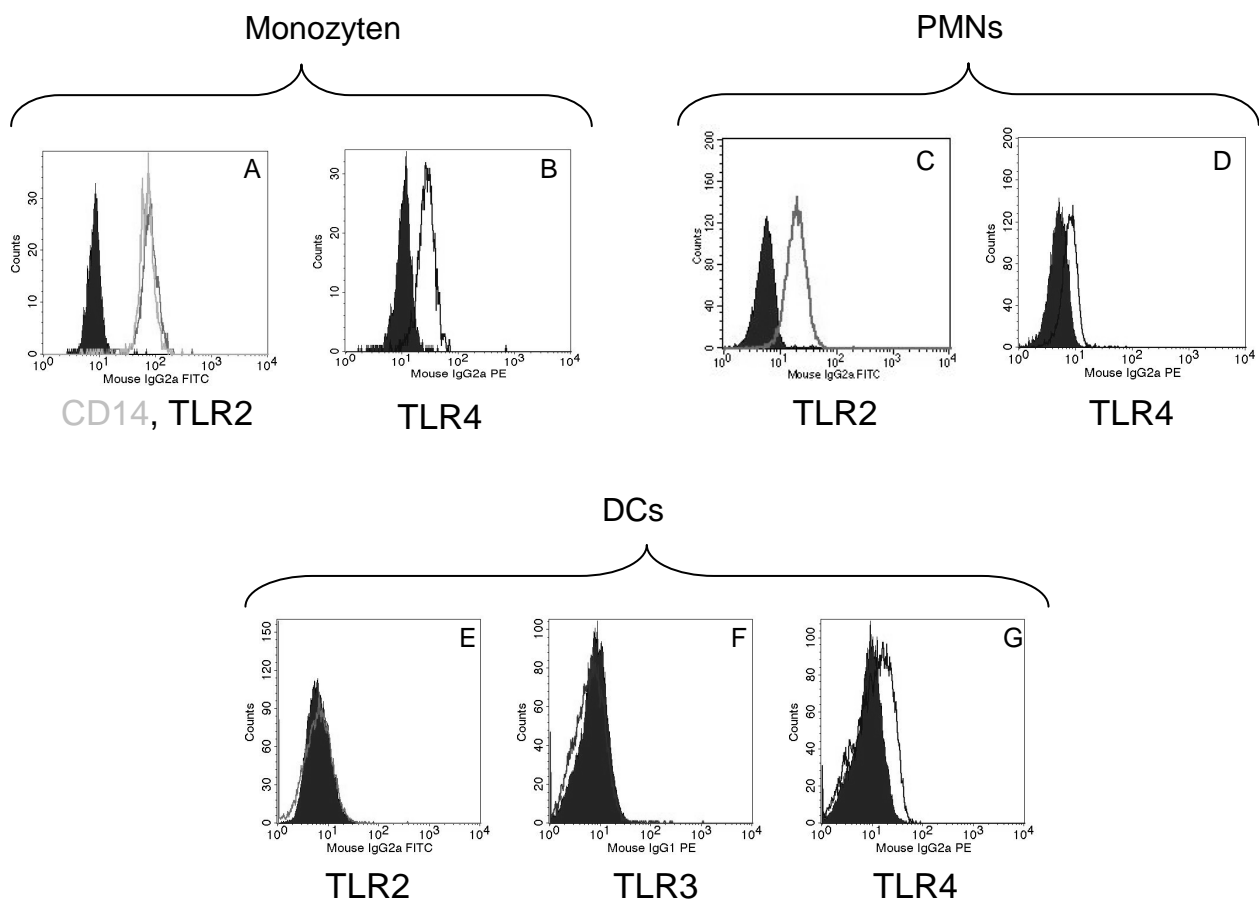


Abbildung 21: CD14, TLR2, TLR3 und TLR4 FACS Analyse von Monozyten (A, B), DCs (C, D) und PMNs (E, F, G). Schwarz schattiert ist die jeweilige Isotypkontrolle. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei Wiederholungen.

Für Monozyten und PMNs konnten TLR2 und TLR4 eindeutig als in der Plasmamembran lokalisierte Rezeptoren nachgewiesen werden (s. Abbildung 21 A und B). Im Gegensatz dazu, waren TLR2 und TLR3 extrazellulär bei DCs nicht zu detektieren. Zwar konnte bei diesem Spender für TLR4 ein schwaches Signal erhalten werden (E), welches aber bei Wiederholung mit anderen Spendern nicht zu sehen war (Daten nicht gezeigt). Auch die Stimulierung von DCs mit LPS und *A. fumigatus* KS führte trotz Ausreifung (s. 4.6.3) zu keinem positiven Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Daraus folgte, dass die Generierung von DCs aus Monozyten, in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF, zur Folge hatte, dass TLR2 und TLR4 auf der Zelloberfläche nicht mehr nachzuweisen waren.

Der Vermutung, dass TLR2 und TLR4 intrazellulär in DCs lokalisiert sein könnten, wurde durch eine intrazelluläre FACS-Färbung (s. 3.5.8) weiter nachgegangen. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde parallel TLR3 und IFN- γ mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

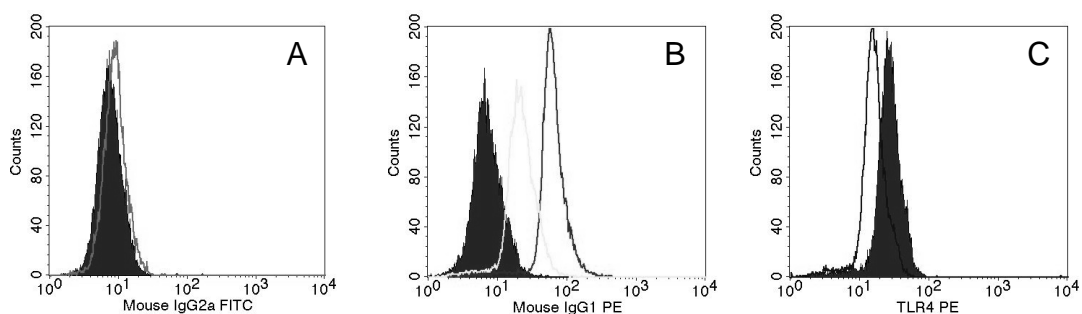


Abbildung 22: Intrazelluläre FACS Analyse für TLR2 (A), IFN- γ , TLR3 (B) und TLR4 (C) bei DCs. Schwarz schattiert ist die jeweilige Isotypkontrolle. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei Wiederholungen.

Im Gegensatz zu TLR2 (A) und TLR4 (C) konnte TLR3 und IFN- γ (B) bei DCs intrazellulär nachgewiesen werden.

4.3 Etablierung eines siRNA Systems für humane DCs

4.3.1 Bestimmung der siRNA-Transfektionseffizienz bei DCs

Für RNAi-Experimente, bei denen die Expression ausgesuchter Gene mittels siRNA reduziert werden sollte, wurde als erstes die Transfektionseffizienz für DCs ermittelt. 1×10^6 Zellen wurden gemäß Abschnitt 3.5.9 per Elektroporation mit einer Cy3 markierten siRNA (s. 3.2.10) transfiziert und 24 h später im FACS (s. 3.5.7) bzw. im Fluoreszenz-

mikroskop analysiert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Cytospin-Präparate hergestellt und mit DAPI gefärbt (s. 3.5.10).

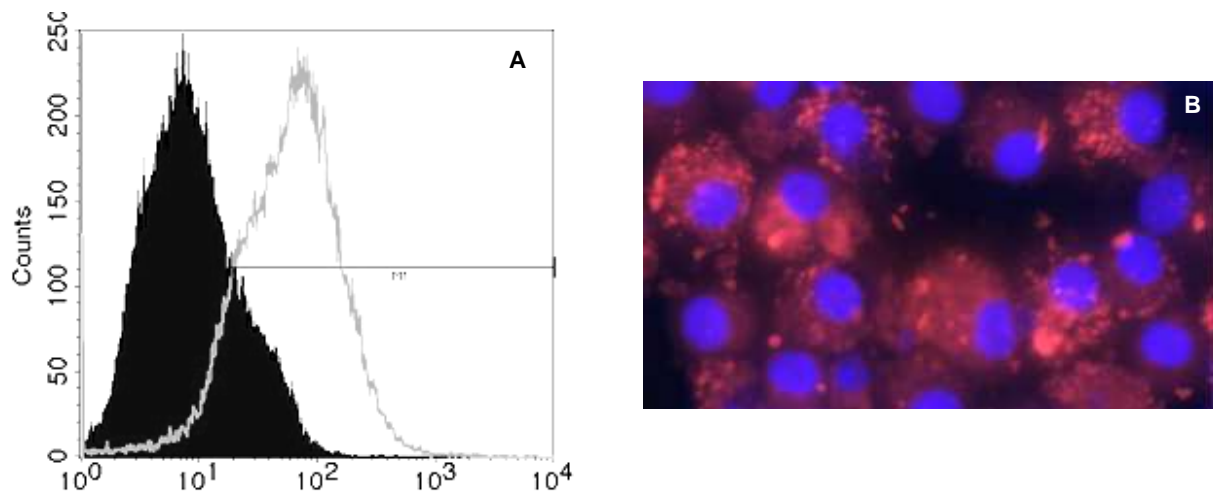


Abbildung 23: Ermittlung der siRNA Transfektionseffizienz mittels FACS-Analyse (A) und Fluoreszenzmikroskopie (B).

Als Anhaltspunkt für eine erfolgreiche Transfektion wurde auf die Bedingungen von Gebhard, 2004 zurückgegriffen, der DCs bereits aussichtsreich mit siRNA transfiziert hatte. Es zeigte sich, dass mit dem Elektroporator gute Transfektionsraten mit einem Stromimpuls von 340 V für 10 ms erzielt wurden. Im Durchflusszytometer ergab sich eine Transfektionseffizienz von ca. 90%, bei der mikroskopischen Auswertung von ca. 80% (80 von 100 ausgezählten Zellen wurden als positiv gewertet).

4.3.2 Untersuchungen zur Dauer und Stärke des RNAi-Effektes

Am Beispiel von TLR2 und TLR3 sollte untersucht werden, wie lange der in DCs durch siRNA induzierte Effekt der verringerten Expression anhält. Um diese Frage zu beantworten, wurden DCs mit TLR2 bzw. TLR3 siRNA transfiziert (s. 3.5.9) und die Expression von *TLR2* und *TLR3* nach Isolierung von RNA (s. 3.6.1) und Umschreibung in cDNA (s. 3.6.3) am *Light Cycler* zu verschiedenen Zeitpunkten (6 h - 120 h) kontrolliert. Alle gezeigten Grafiken enthalten ausschließlich normalisierte Werte (s. 3.6.5).

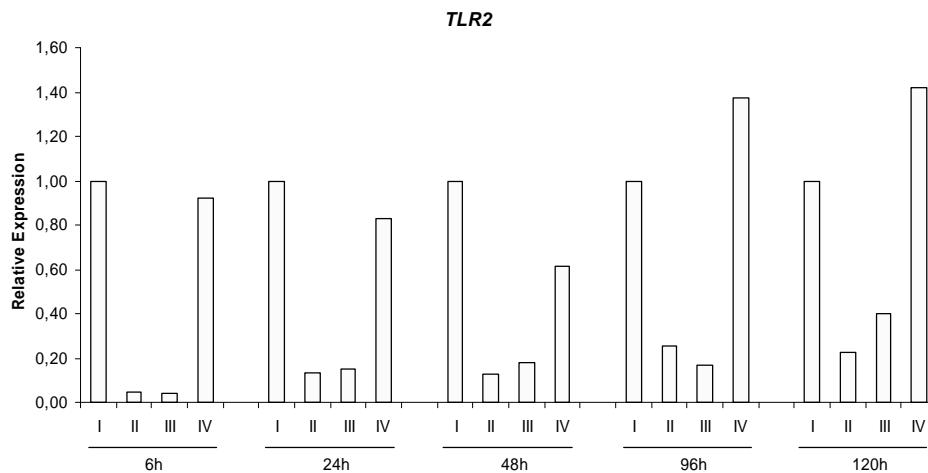


Abbildung 24: Relative Expression von *TLR2* bei DCs im zeitlichen Verlauf nach *TLR2* siRNA Transfektion. Die Zellen wurden entweder mit siRNA (II, III) oder mit der *non-silencing* Kontrolle (IV) transfiziert und die Expression zum jeweiligen Zeitpunkt (nach Normalisierung) auf den Ansatz ohne siRNA (I) bezogen.

6 h nach *TLR2* siRNA Transfektion wurde eine Reduktion der Expression um 95% (II) bzw. 96% (III) erreicht. Diese Reduktion sank nach 24 h auf 87% (II) bzw. 85% (III) und nach 48 h auf 87% (II) bzw. 82% (III). Nach weiteren 48 h sank die Reduktion auf 75% (II) bzw. 73% (III). In einigen Ansätzen mit der *non-silencing* Kontrolle wurde eine leicht veränderte *TLR2* Expression beobachtet, die allerdings als nicht signifikant gewertet wurde.

Ein ähnliches Bild wie bei den Untersuchungen zur *TLR2* siRNA Transfektion ergab sich bei Verwendung der beiden *TLR3* siRNAs.

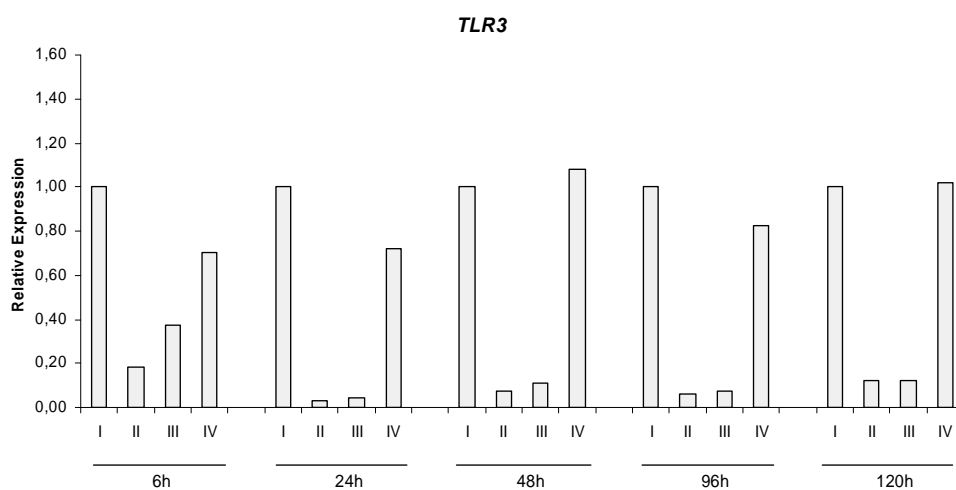


Abbildung 25: Relative Expression von *TLR3* bei DCs im zeitlichen Verlauf nach *TLR3* siRNA Transfektion. Zellen wurden entweder mit siRNA (II, III) oder mit der *non-silencing* Kontrolle (IV) transfiziert und die Expression zum jeweiligen Zeitpunkt (nach Normalisierung) auf den Ansatz ohne siRNA (I) bezogen.

Der Einsatz der beiden TLR3 siRNAs führte, im Gegensatz zur Kontroll-siRNA, zu einer verringerten TLR3 Expression. 24 h nach Transfektion waren die Effekte am stärksten, wobei eine Reduktion um etwa 95% erzielt wurde. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Experimente dem Zeitpunkt von 24 h der Vorzug gegeben.

4.3.3 Cytokin-Induktion durch RNAi?

Unlängst wurde nachgewiesen, dass die Methode der RNAi neben all ihren positiven Anwendungsmöglichkeiten auch unerwünschte Nebeneffekte haben kann (Marques und Williams, 2005). So konnten Kariko *et al.* im Jahr 2004 zeigen, dass die Transfektion von Makrophagen mit einer siRNA, die gegen die mRNA des Mannose Rezeptors gerichtet war, gleichzeitig zu einer starken Freisetzung von IFN- α , IFN- β und TNF- α führte.

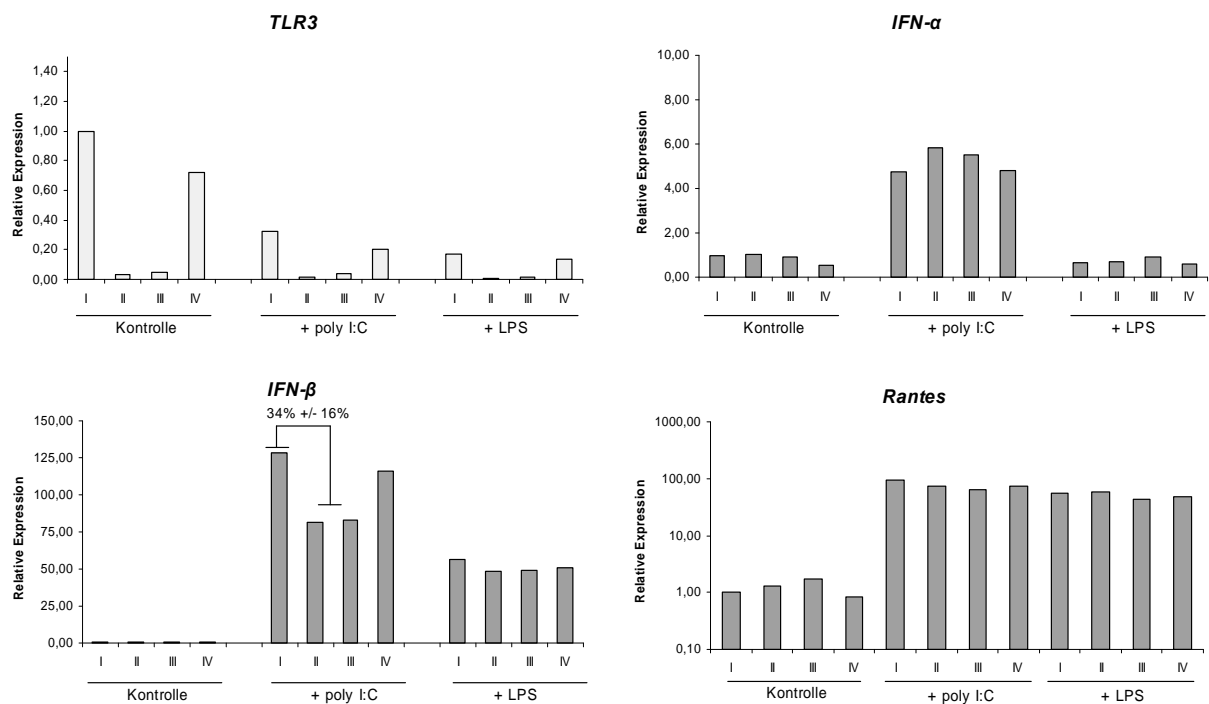
Ob ein ähnlicher Effekt auch beim Einsatz der Elektroporation zu beobachten ist, sollte am Beispiel von mit TLR2 siRNA transfizierten DCs untersucht werden. Dabei wurde die Expression von IFN- α , IFN- β , TNF- α , IL-10 und IL-12 24 h nach Transfektion am *Light Cycler* kontrolliert (s. 3.6.4). Zur Expressionsanalyse von IFN- α und IFN- β wurde das *Light Cycler Primer Set Human Interferon- α und Human Interferon- β* der Firma *Search LC* verwendet. Es zeigte sich, dass die Verwendung der beiden TLR2 siRNAs (II und III) und der *non-silencing* Kontrolle (IV) zu keiner signifikanten Erhöhung der Expression von IFN- α , IFN- β , TNF- α , IL-10 und IL-12 führte (Daten nicht gezeigt). Auch spätere Experimente mit TLR3 siRNA (s. 4.4), TLR4 siRNA (s. 4.7.3), DC-SIGN siRNA, PTX-3 siRNA (s. 4.7.7), Dectin-1 siRNA (s. 4.7.9) und Card-9 siRNA (s. 4.7.11) zeigten keine Induktion von TNF- α und IL-12.

Anhand dieser Untersuchungen wurde deutlich, dass sich die Methode der Elektroporation mit den hier verwendeten Parametern zur erfolgreichen Transfektion von DCs eignete. Gleichzeitig waren keine Cytokin-Induktionen als unerwünschte Nebeneffekte zu erwarten.

4.4 Identifikation eines Rezeptors für HCMV auf DCs

4.4.1 Transfektion von DCs mit TLR3 siRNA und Stimulation mit poly I:C bzw. LPS

Als natürlicher Ligand für TLR3 wurde dsRNA identifiziert (Alexopoulou *et al.*, 2001). Mit Hilfe einer synthetisch hergestellten dsRNA (poly I:C) konnte der durch TLR3 vermittelte TRIF-IRF3 abhängige Signalweg genauer erforscht werden. In dieser Doktorarbeit sollte die TLR3 Expression in DCs mittels spezifischer TLR3 siRNAs runterreguliert werden, um nach poly I:C Stimulierung die Expression von im TLR3 Signalweg involvierten Genen (*IFN- α* , *IFN- β* , *Rantes*, *CXCL10*, *CXCL11*) zu untersuchen. Als Kontrolle wurde mit LPS stimuliert. Zur Analyse von *IFN- α* und *IFN- β* wurde für alle folgenden PCRs die im Abschnitt 3.2.8 und 3.2.9 angegebenen Primer und Sonden verwendet.



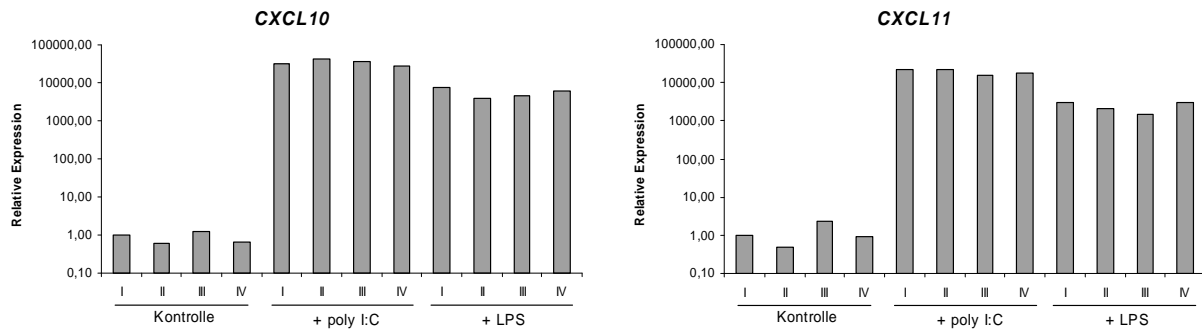


Abbildung 26: Relative Expression von *TLR3*, *IFN- α* , *IFN- β* , *Rantes*, *CXCL10* und *CXCL11*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit *TLR3* siRNA (II, III) oder mit der *non-silencing* Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit 25 μ g/ml poly I:C bzw. 1 μ g/ml LPS stimuliert.

Die beiden verwendeten *TLR3* siRNAs hatten eine 93%-ige [91-95%] (II) bzw. 91%-ige [83-96%] (III) Reduktion der *TLR3* Expression zur Folge. Die Stimulierung mit poly I:C bzw. mit LPS führte zu einer verringerten *TLR3* Expression, die durch den Einsatz der siRNAs deutlich verstärkt wurde. Die *non-silencing* Kontrolle zeigte in allen Ansätzen dieselbe Expression wie in den Ansätzen mit den nicht-transfizierten Zellen.

Bei der Analyse der Expression von im *TLR3* Signalweg involvierten Genen stellte sich heraus, dass es durch Stimulierung mit 25 μ g poly I:C zu einem eindeutigen Anstieg von *IFN- α* , *IFN- β* , *Rantes*, *CXCL10* und *CXCL11* und kam. Im Gegensatz dazu blieb die Expression von *NF κ B* nahezu unverändert.

Bezüglich *IFN- β* war der poly I:C vermittelte Anstieg abgeschwächer (34% +/- 16%), wenn die Zellen zuvor mit *TLR3* siRNA transfiziert wurden. Dies deutete auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen der *TLR3* Expression und der Expression von *IFN- β* hin. Für *IFN- α* , *Rantes*, *CXCL10*, *CXCL11* und *NF κ B* konnte eine solche Beobachtung nicht gemacht werden.

Wurden als Kontrolle die Zellen mit LPS stimuliert, so hatte dies eine, im Vergleich zur poly I:C Stimulierung, abgeschwächte Induktion von *IFN- β* und keine veränderte Expression von *IFN- α* zur Folge. Im Gegensatz dazu kam es erwartungsgemäß zu einer Erhöhung von *TNF- α* und *IL-12* (Daten nicht gezeigt). Dasselbe wurde auch von Alexopoulou *et al.* (2001) für Maus-Makrophagen beobachtet. Bei keinem der mit *TLR3* siRNA transfizierten Ansätze konnte eine Verringerung in den Expressionen der analysierten Gene beobachtet werden.

Ob der Einsatz der *TLR3* siRNA tatsächlich eine signifikant verringerte *IFN- β* Expression nach poly I:C Stimulierung nach sich zieht, wurde nochmals überprüft, indem DCs nicht nur für 24 h mit siRNA transfiziert wurden, sondern für 48 h. Anschließend wurde

wie im vorherigen Experiment für 6 h mit poly I:C stimuliert und die gewohnten Expressionsanalysen durchgeführt. Erneut war eine reduzierte Expression von *IFN-β* zu beobachten, wenn die Zellen mit TLR3 siRNA transfiziert wurden. Auch die Tatsache, dass für *IFN-α*, *Rantes*, *CXCL10*, *CXCL11* und *NFκB* diese Effekte nicht zu sehen waren, konnte reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

In der Diplomarbeit von Florian Gebhardt (2004) können weitere Experimente zur TLR3 und poly I:C Stimulierung (in Konzentrationen von 2,5 ng/ml bis 25 µg/ml) nachgelesen werden.

4.4.2 Nachweis von Phospho-IRF-3 mittels Western Blot

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass der TLR3 Ligand poly I:C die Expression von Interferonen induziert. Zur Bestätigung, dass dabei eine Signaltransduktion über TLR3 und IRF-3 vermittelt wird, sollte mit Hilfe eines Antikörpers erfolgen, der laut Hersteller nur die phosphorylierte, und somit aktivierte Form von IRF-3 erkennt. Zu Beginn wurden verschiedene Arten der Proteinisolierung ausprobiert. Als gänzlich ungeeignet stellte sich der *Qproteome Mammalian Protein Preparation Kit* von QIAGEN heraus, da damit nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt wurden (Daten nicht gezeigt). Am einfachsten war es, die Zellen in SDS-Ladepuffer (s. 3.2.4) aufzunehmen und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 95°C aufzukochen. Für den Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran wurde eine Stromstärke von 160 mA gewählt. Dies entsprach 3,5 mA / cm² und erlaubte einen effizienten Protein-Transfer auf die Membran, der mittels Ponceau-Färbung kontrolliert wurde.

Es wurde eine Gegenüberstellung der Detektion mit Alkalischer Phosphatase versus Chemolumineszenz gemacht, wobei sich deutlich herausstellte, dass letzteres die sensitivere Methode war. Bereits nach wenigen Sekunden Exposition des Röntgenfilms war ein starkes Signal für β-Actin (Ladekontrolle) sichtbar. Somit wurde dem Nachweis mittels Chemolumineszenz für das weitere Vorgehen der Vorzug gegeben.

Bei Verwendung des α-Phospho-IRF-3 Antikörpers war die bei 51 kDa befindliche Bande immer gleich stark, egal ob die Zellen mit poly I:C behandelt wurden oder nicht (s. Abbildung 27). Dies bedeutete, dass der Antikörper nicht für fortführende Analysen verwendet werden konnte.

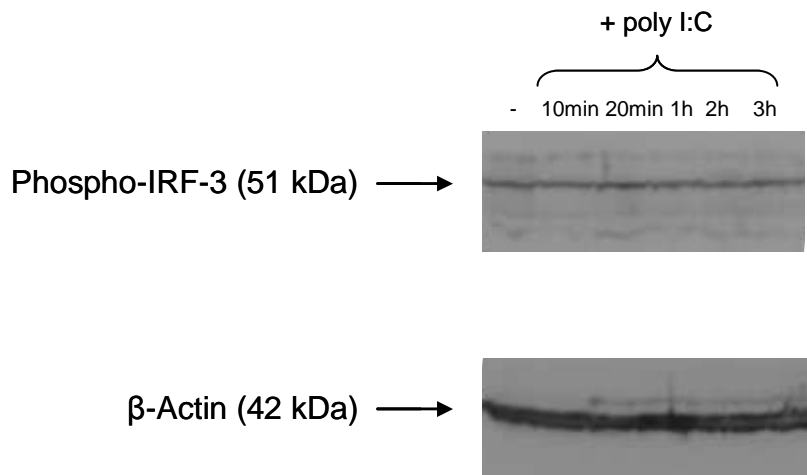
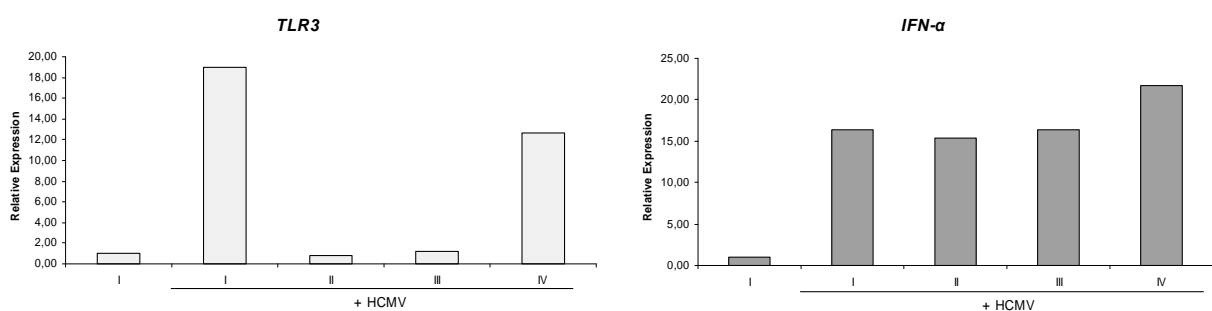


Abbildung 27: Phospho-IRF-3 Western Blot.

4.4.3 Rolle von TLR 3 bei der Erkennung von HCMV

Die Experimente mit TLR3 siRNA und poly I:C Stimulation erbrachten den Beleg dafür, dass es einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Expression von *TLR3* und der Induktion von *IFN-β* gibt (s. 4.4). Somit sollte es denkbar sein, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von DCs über TLR3 durch HCMV aufzuzeigen. Analog zu den vorherigen Experimenten wurden DCs für 24 h mit TLR3 siRNA transfiziert und anschließend für 24 h mit HCMV-Konzentrat mit einer MOI von 10 infiziert (s. 3.3.5).



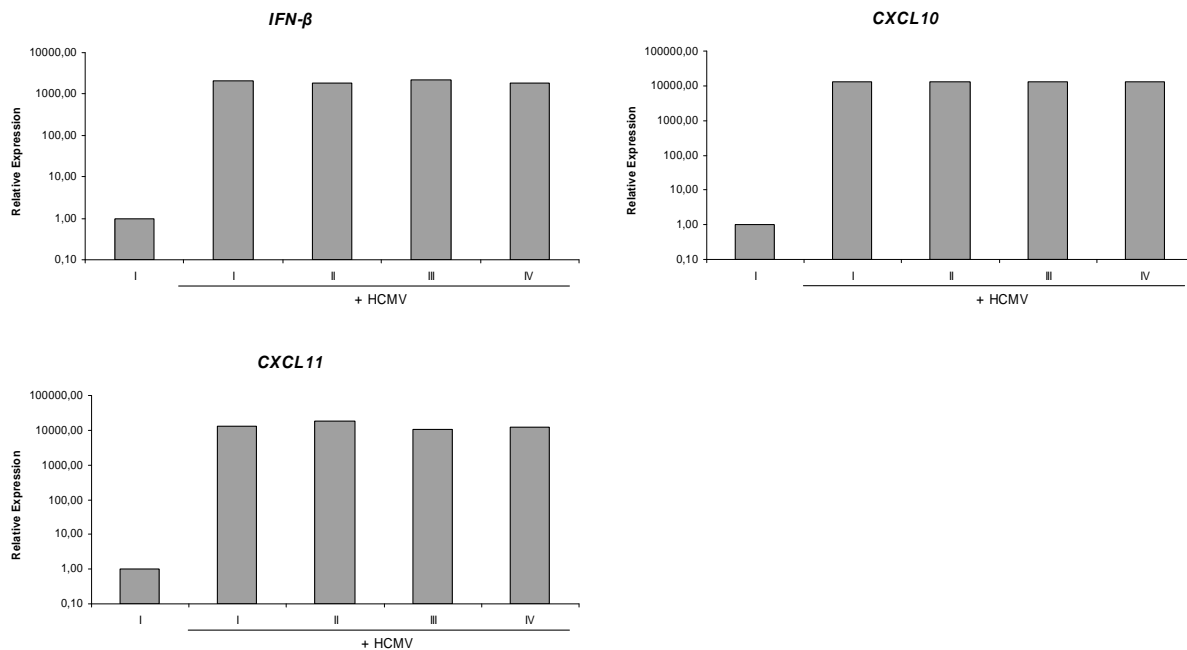


Abbildung 28: Relative Expression von *TLR3*, *IFN-α*, *IFN-β*, *CXCL10* und *CXCL11*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit *TLR3* siRNA (II, III) oder mit der *non-silencing* Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit dem HCMV Stamm TB40 (MOI=10) infiziert.

Die beiden siRNAs verringerten die Expression von *TLR3* signifikant um jeweils 93% [86-96%] (II) bzw. 91% [87-95%] (III). Durch die Infektion der DCs kam es zu einer starken Expression von *CXCL10*, *CXCL11* und *IFN-β*. Allerdings konnte kein funktioneller Zusammenhang zwischen *TLR3* und der Induktion von *IFN-β* aufgezeigt werden, da in den mit siRNA transfizierten Ansätzen die Expression nicht geringer ausfiel.

Auch bei der Wiederholung des Experimentes mit einer MOI von 10 und einer Infektionsdauer von 6 h konnte kein funktioneller Zusammenhang zwischen *TLR3* und *IFN-β* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.4 Rolle von TLR9 bei humanen DCs

In der Maus wurde TLR9 als Rezeptor für das murine Cytomegalievirus (MCMV) identifiziert (Tabeta *et al.*, 2004). Da TLR9 bislang noch nicht als Rezeptor für HCMV bestätigt wurde, sollte zunächst untersucht werden, ob TLR9 von DCs exprimiert wird und auf CpG DNA mit einer Interferonantwort reagierten. Bei CpG DNA handelte es sich um ein synthetisch hergestelltes Oligonukleotid mit CpG Motiv (s. 3.2.7), welches 2001 von Bauer *et al.* als TLR9 Ligand beschrieben wurde.

Pro Ansatz wurden 1×10^6 DCs mit TLR9 siRNA transfiziert und durch Zugabe von CpG DNA in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ (= $3,2 \mu\text{g} / \text{ml}$) für 6 h stimuliert. Anschlies-

send erfolgte wie gewohnt die Isolierung der RNA, die Reverse Transkription und die Kontrolle der Expression von *TLR9*, *IFN- α* , *IFN- β* , *IL-12* und *TNF- α* am *Light Cycler*.

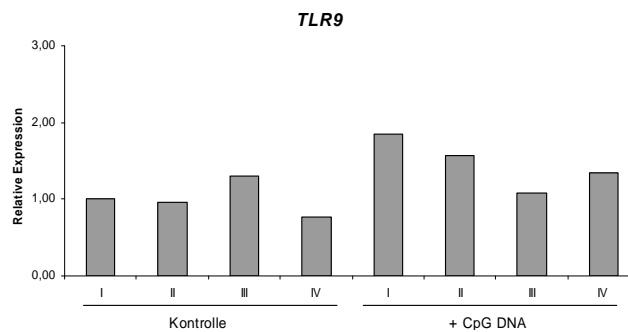


Abbildung 29: Relative Expression von *TLR9*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit *TLR9* siRNA (II, III) oder mit der non-silencing Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit 1 μ M CpG DNA stimuliert.

Mit dem *Light Cycler* konnte für *TLR9* eine extrem niedrige Expression nachgewiesen werden, wobei diese durch den Einsatz von siRNA nicht signifikant verändert wurde (s. Abbildung 29). Die Amplifikationseffizienz der PCR wurde mit einem externen Standard kontrolliert (s. 3.6.7) und betrug 1,7 (Maximum: 2,0). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass eine schlechte Amplifikationseffizienz der Grund für das schwache *TLR9* Signal war. Die Quantifizierung mit einem externen Standard ergab 5 Kopien / μ l cDNA (im Vergleich zu *TLR2*: 30.000 Kopien / μ l cDNA) und bewegte sich somit am Rande der Sensitivität des *Light Cyclers*.

Es zeigte sich ferner, dass die Stimulation mit CpG DNA zu keiner deutlichen Veränderung der Expression von *IFN- α* , *IFN- β* , *IL-12* und *TNF- α* führte (Daten nicht gezeigt). Dies wäre laut Hersteller *Invitrogen* unter diesen experimentellen Bedingungen zu erwarten gewesen. Eine Verlängerung der CpG DNA Stimulationszeit auf 24 h, ohne vorherige siRNA Transfektion, führte zu demselben Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf weitere Untersuchungen zur Interaktion zwischen *TLR9* und HCMV verzichtet.

4.4.5 Untersuchung der durch HCMV induzierten Immunantwort nach DC-SIGN / *TLR2* siRNA Transfektion

Die Experimente aus den vorangegangenen Abschnitten (s. 4.4.3 und 4.4.4) gaben Anlass zu der Annahme, dass die bereits während der frühen Phase der Infektion induzier-

te Expression von Klasse I Interferonen (s. 4.1.4) bei humanen DCs nicht durch die intrazellulären Rezeptoren TLR3 und TLR9 beeinflusst wird, sondern eine Erkennung durch sich auf der Plasmamembran befindlichen Immunrezeptoren erfolgen könnte. Da eine Interaktion zwischen HCMV und TLR2 (Compton *et al.*, 2003) und DC-SIGN (Halary *et al.*, 2002) bereits nachgewiesen wurde, sollte dies im Rahmen dieser Arbeit mittels siRNA näher untersucht werden.

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, wurden DCs für 24 h mit TLR2 und / oder DC-SIGN siRNA transfiziert und für 6 h mit HCMV-Konzentrat mit einer MOI von 10 stimuliert (s. 3.3.5).

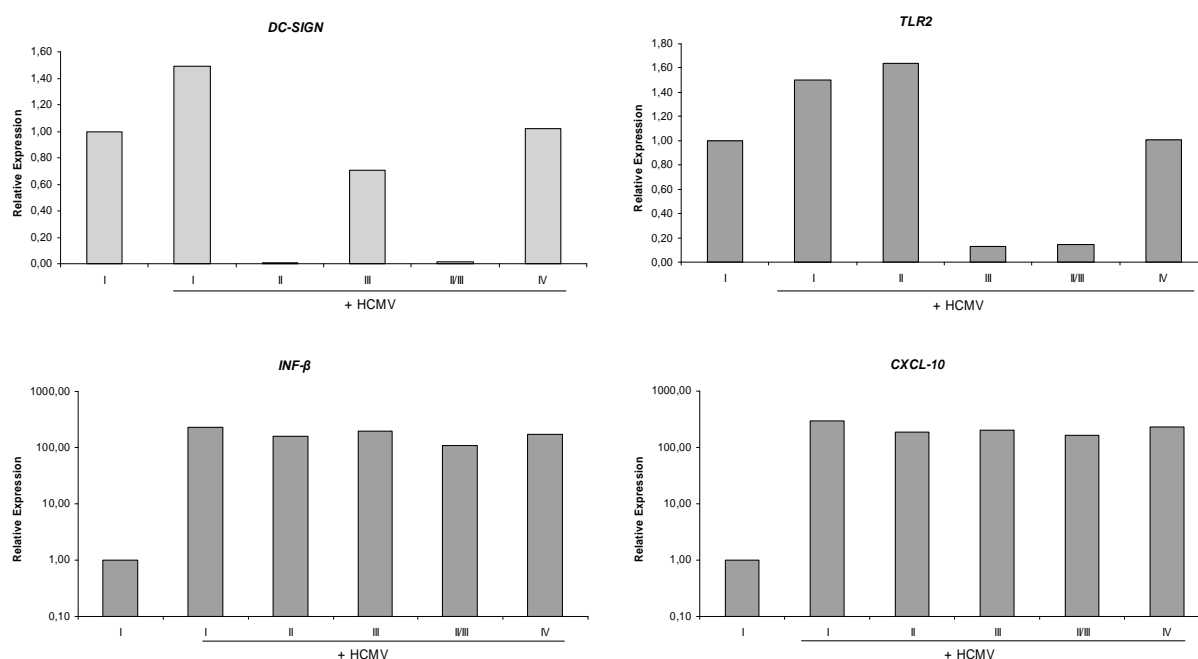


Abbildung 30: Relative Expression von *DC-SIGN*, *TLR2*, *IFN-β* und *CXCL10*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit *DC-SIGN* siRNA (II), *TLR2* siRNA (III), beiden siRNAs (II/III) oder mit der *non-silencing* Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit dem HCMV Stamm TB40 (MOI=10) infiziert und die Expression ausgesuchter Gene mittels qRT-PCR ermittelt.

Die beiden siRNAs gegen *DC-SIGN* und *TLR2* verringerten spezifisch die Expression des jeweiligen Gens (*DC-SIGN*: 98% [97-99%]; *TLR2*: 92% [89-96%]). Durch die Infektion der DCs mit HCMV kam es zu einer Erhöhung von *IFN-β* und *CXCL10*, wobei die Expression nicht reduziert war, wenn zuvor die Expression von *DC-SIGN* verringert wurde. Auch das gleichzeitige Ausschalten von *TLR2* und *DC-SIGN* (II/III) veränderte die Expression von *IFN-β* und *CXCL10* nicht.

4.5 Zusammenhang zwischen SNPs in *Entry-Rezeptorgenen* und einem erhöhten Risiko für eine HCMV Reaktivierung / Erkrankung

Über das gesamte humane Genom verteilt konnten bis heute mehrere Mio Einzelba-senpolymorphismen (SNP) identifiziert werden (*The International SNP Map Working, 2001*), von denen einige im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für bestimmte Krankheiten beschrieben wurden (Haukim *et al.*, 2002). Auch für SNPs in Genen, die für TLRs codieren, konnten solche Zusammenhänge entschlüsselt werden (Übersicht in Schroder und Schumann, 2005).

Im Vorfeld dieser Doktorarbeit wurde nach einem möglichen Zusammenhang zwischen ausgesuchten SNPs in immunrelevanten Genen und einem erhöhten Risiko für eine HCMV-Reaktivierung / Erkrankung nach Stammzelltransplantation gesucht (Löffler *et al.*, 2006). Hierfür wurde zwischen 1994 und 2003 DNA aus Blut von Patienten (n = 194) am Tag 30 nach Stammzelltransplantation isoliert. Die so entstandene DNA-Bibliothek beinhaltete DNA von 65 Patienten ohne HCMV Reaktivierung / Erkrankung, 70 Patienten mit Reaktivierung und 59 Patienten mit Erkrankung. Weiterführende Infor-mationen zum Patientenkollektiv finden sich in Löffler *et al.*, 2006.

Die Patienten-Proben sollten nun dahingehend untersucht werden, ob es einen Zu-sammenhang zwischen einem SNP in einem Gen, das für einen bekannten HCMV Re-zeptor codiert (s. 2.1.3), und einem erhöhten Risiko für eine HCMV Reaktivierung bzw. Erkrankung gibt.

Vor Beginn der eigentlichen Genotypisierungen (s. 3.6.6) wurden die jeweiligen Primer-paare (FR und SA) mittels konventioneller PCR (s. 3.6.7) und Agarosegelelektrophore-se (s. 3.6.8) auf ihre Funktionalität hin getestet. Wenn nicht anders angegeben, wurde für die PCR mit dem *Light Cycler* jeweils das Primerpaar FR verwendet. Bis auf die Primer, die zur Analyse des SNPs rs11543848 (*EGFR*) verwendet wurden, war für alle Primerpaare ein PCR-Produkt in der zu erwartenden Größe auf dem Agarosegel zu se-hen (Daten nicht gezeigt).

Beim SNP mit der Nummer rs1042381 im *SDC2* Gen war es trotz Austesten verschie-dener Primerkombinationen (*SDC2* FR, SA, FA, SR) und $MgCl_2$ -Konzentrationen (2 mM - 4 mM, in 0,5 mM Schritten) nicht möglich, mit den synthetisierten Sonden *SDC2 mut* und *SDC2 Anchor* verschiedene Genotypen zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Nach Rücksprache mit TIB MOLBIOL stellte sich heraus, dass die für die Detektion des SNPs

wichtige Sonde *SDC2 mut* die eigenen Qualitätskriterien nicht erfüllte, so dass kostenlos eine neue Sonde zur Verfügung gestellt wurde. Die neue Sonde war am 5'-Ende um 2 Nukleotide verkürzt (*SDC2 mut short*) und erlaubte nun die Detektion der homozygoten (TT) und heterozygoten (AT) Allele, obgleich keine schönen Schmelzkurven erhalten wurden. Auch ein mehrfaches Schmelzen bei 0,1°C/s, 0,15°C/s und 0,2°C/s ergab keine ansehnlicheren Schmelzkurven, reichte aber dennoch für eine Bestimmung der Genotypen aus (s. Abbildung 31 A). Zur Bestätigung der Genotypen, die bei den Schmelzkurvenanalysen gewonnen wurden, wurde die DNA von verschiedenen Patienten sequenziert (s. 3.6.9). Hierbei konnten die Ergebnisse des *Light Cyclers* bestätigt werden (F). Homozygote Patienten hatten den Genotyp TT, wohingegen bei heterozygoten Patienten ein N (A oder T) an dieser Stelle im Elektropherogramm angezeigt wurde.

Die Konstruktion von Primern zur Analyse von rs11543848 (*EGFR*) bereitete einige Schwierigkeiten, die nur durch den Einbau von Fehlbasen in den *Forward* Primer umgangen werden konnten. In der konventionellen PCR konnte zunächst kein spezifisches PCR-Produkt erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Im *Light Cycler* war dies erst nach dem Austesten verschiedener MgCl₂-Konzentrationen und Primerkombinationen und der Analyse der PCR-Produkte auf dem Agarosegel (s. 3.6.8) möglich. Die Primerkombination FR und eine MgCl₂-Konzentration von 3 mM lieferten die besten Resultate, so dass Sonden nachbestellt und die Genotypisierungen durchgeführt werden konnten (B). Auch für diesen SNP wurde zur Bestätigung die DNA von verschiedenen Patienten sequenziert und die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalysen verifiziert. Abbildung 31 G zeigt die DNA-Sequenz zweier homozygoten Patienten (TT und CC) in 3'-5' Orientierung, so dass die eigentliche Einzelbasenmutation einen Austausch von A nach G beinhaltete.

Keine Probleme bei der Amplifikation ergaben sich bei der Analyse des SNPs rs10251977 im *EGFR* Gen, obwohl auch hier ein Primer (*EGFR mis*) eine Fehlbasenpaarung aufwies (C).

Der SNP rs5921 im *ITGB3* Gen war bei der Auswahl der SNPs im Juni 2005 mit einer Häufigkeit der heterozygoten Allele für 49,5% in der Datenbank von NCBI angegeben. Allerdings stellte sich bei der Genotypisierung heraus, dass alle getesteten Patienten, egal aus welcher Patientengruppe, denselben Genotyp (GG) hatten (D). Daher wurde DNA von fünf zufällig ausgewählten Patienten sequenziert (s. 3.6.9). In Abbildung 31 H

ist exemplarisch die Sequenz einer Patienten-Probe wiedergegeben. Seit Oktober 2005 ist die in der Datenbank angegebene Häufigkeit auf 0,5% korrigiert.

Ein weiterer SNP im *ITGB3* Gen (rs12709459) ergab mit nur 50 PCR-Zyklen schlecht auswertbare Schmelzkurven, die durch 10 zusätzliche Zyklen deutlich verbessert und durch weitere 10 Zyklen nicht mehr verändert wurden (E).

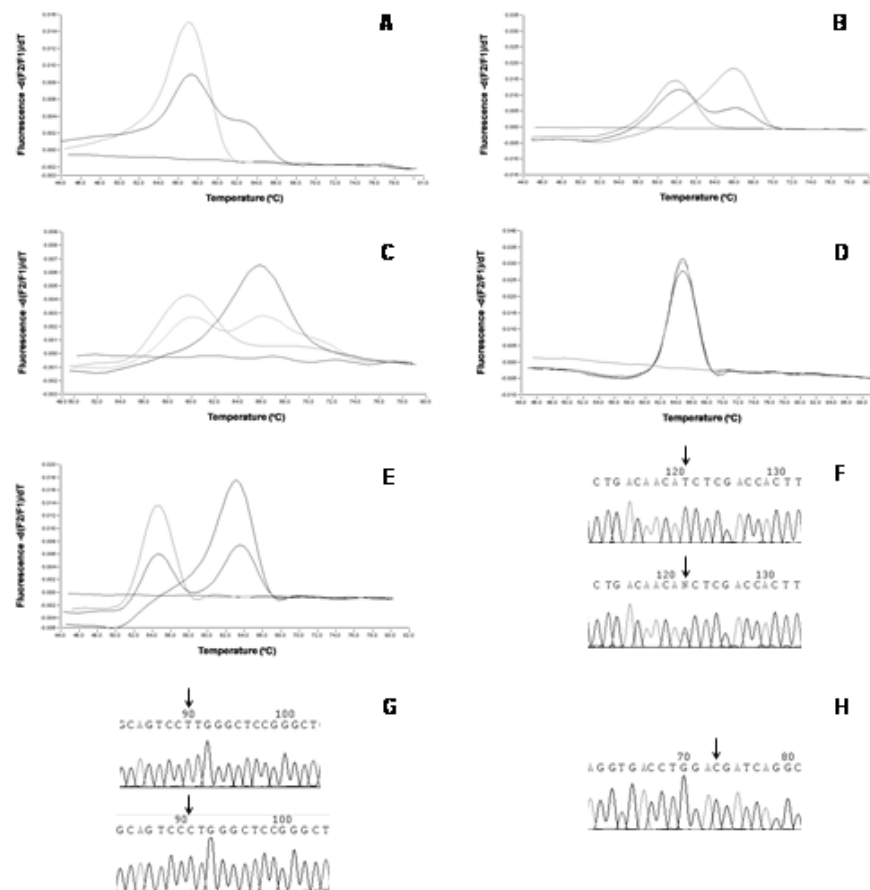


Abbildung 31: Schmelzkurvenanalysen am *Light Cycler*. A) *SDC2* (rs1042381) B) *EGFR* (rs11543848), C) *EGFR* (rs10251977), D) *ITGB3* (rs5921), E) *ITGB3* (rs12709459). Es sind jeweils die möglichen Schmelzkurven bei der Genotypisierung von homozygoten und heterozygoten Patienten, sowie eine Negativkontrolle (H₂O), zu sehen. Zur Bestätigung der Ergebnisse am *Light Cycler* wurden ausgesuchte Patienten-DNA sequenziert: F) *SDC2* (rs1042381), G) *EGFR* (rs11543848), H) *ITGB3* rs5921. Mit einem schwarzen Pfeil (↓) ist jeweils die Stelle des SNPs markiert.

Neben der Sequenzierung (s. 3.6.9) und der Schmelzkurvenanalyse am *Light Cycler* (s. 3.6.6) wurde eine weitere Methode angewendet, um Genotypisierungen durchzuführen. Mittels MALDI-MS (s. 3.6.10) wurden zwei SNPs (rs2287886 und rs735240) aus dem Promotorbereich von *DC-SIGN* analysiert. Die Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für klinische Biochemie der Universität Würzburg (Prof. Michael Zimmer, MTA Gunnar-Ingi Kristjansson) durchgeführt. Im Vergleich zur SNP-Analyse mit dem

Light Cycler waren die Genotypisierungen mittels MALDI-TOF durch das Nicht-Vorhandensein eines PCR-Produktes limitiert. So konnte nur für 145 / 194 (rs2287886) bzw. für 152 / 194 (rs735240) ein PCR-Produkt erhalten werden (s. 3.6.7). Mittels MALDI-MS wurden von jedem Patientenkollektiv jeweils 40 Proben analysiert. In folgender Abbildung ist exemplarisch die massenspektrometrische Auswertung eines heterozygoten Patienten für rs2287886 (C/T) gezeigt.

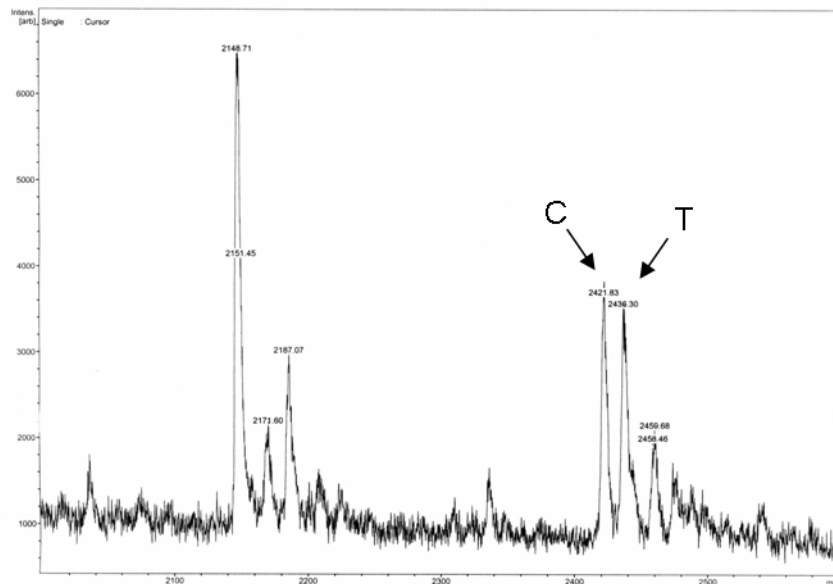


Abbildung 32: MALDI-MS zur SNP-Analyse von rs2287886 (*DC-SIGN*). Gezeigt ist das massenspektrometrische Histogramm eines für diesen SNP heterozygoten Patienten (C/T). Der Peak mit der größten Intensität stellt den Primer alleine dar, ohne dass dieser um ein Didesoxynukleotid verlängert worden ist.

Alle Daten wurden mit dem Allel-Frequenz-Differenz-Test vom Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Dr. Michael Steffens) statistisch ausgewertet. p -Werte kleiner als $p < 0.010$ wurden als signifikant betrachtet (s. 3.9).

Gen	dbSNP Nummer	Allel	Kontrolle	Reaktivierung	Erkrankung	Kontrolle vs. Reaktivierung	Kontrolle vs. Erkrankung	Reaktivierung vs. Erkrankung
<i>DC-SIGN</i> (19p13)	rs2287886 -139 C/T	C/C	17	11	24	0.197	0.087	0.003
		C/T	18	21	12			
		T/T	4	6	2			
	rs735240 -939 A/G	A/A	13	3	8	0.010	0.034	0.598
		A/G	16	19	16			
		G/G	7	12	15			
<i>EGFR</i> (7p21)	rs11543848 142285 A/G	A/A	3	5	3	0.757	0.690	0.918
		A/G	17	18	19			
		G/G	35	39	32			
	rs10251977 162093 A/G	A/A	26	18	23	0.996	0.974	0.971
		A/G	22	28	19			
		G/G	11	5	10			
<i>ITGB3</i> (17q21.32)	rs12709459 37110 A/C	A/A	27	21	25	0.066	0.892	0.055
		A/C	28	27	25			
		C/C	7	15	6			
<i>SDC2</i> (8q22-q23)	rs1042381 108162 A/T	A/A	0	0	1	0.304	0.274	0.037
		A/T	21	15	23			
		T/T	43	48	33			

Tabelle 30: Statistische Auswertung zur SNP-Analyse im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für eine HCMV Reaktivierung / Erkrankung. In der Tabelle ist die Anzahl an homozygoten und heterozygoten Patienten aufgelistet, die für den statistischen Vergleich der jeweiligen Gruppen herangezogen wurden. Die mittels Allel-Frequenz-Differenz-Test ermittelten p-Werte $p < 0.010$ sind **fett** markiert. Die Positionen der jeweiligen SNPs wurden unter <http://snpper.chip.org> ermittelt.

Die beiden analysierten SNPs (rs2287886 und rs735240) im Promotor-Bereich von *DC-SIGN* wiesen eine hoch signifikante Assoziation ($p < 0.010$) mit einem erhöhten Risiko für eine HCMV Reaktivierung bzw. Erkrankung auf. Auch rs1042381 (*SDC2*) schien mit einem erhöhten Risiko für eine HCMV Erkrankung assoziiert zu sein, wenn bereits eine HCMV Reaktivierung vorlag.

Um die Frage zu beantworten, ob die beiden Risiko-Allele eine abgeschwächte Expression von *DC-SIGN* zur Folge haben, sollten funktionelle Analysen klären. Bei der Genotypisierung von DNA-Proben von 29 gesunden Spendern mittels MALDI-MS (s. 3.6.10), gab es jeweils fünf Spender, die homozygot waren für **CC** bzw. **TT** (rs2287886), sowie **AA** bzw. **GG** (rs735240). Von diesen Personen wurde Blut abgenommen, DCs generiert (s. 3.5.4) und mittels qRT-PCR (s. 3.6.4) die Expression für *DC-SIGN* ermittelt (s. Abbildung 33). Aus der Literatur war bekannt, dass IL-4, welches zusammen mit GM-CSF zur DC-Generierung verwendet wird, zu einer starken Expression von *DC-SIGN* führt (Li *et al.*, 2006).

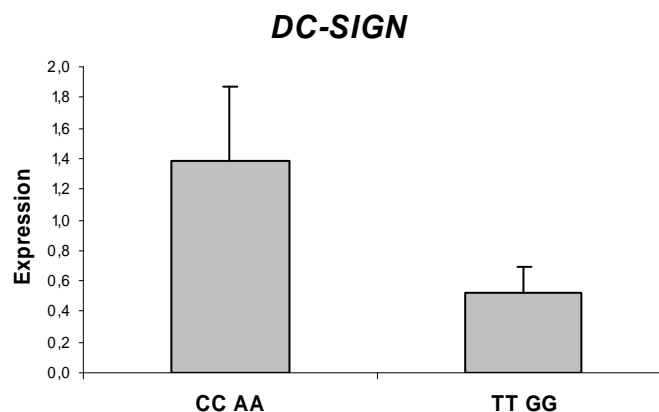


Abbildung 33: Expression von *DC-SIGN* in DCs mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund. Es wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der *DC-SIGN* Expression von jeweils fünf Spendern berechnet.

Die Expression von *DC-SIGN* war in den DCs höher, die von Spendern mit der Allelkombination CC AA stammten, als bei solchen mit TT GG ($p = 0.057$).

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Virologie, Tübingen (Dipl. Biol. Tobias Kessler) wurde weiterhin untersucht, ob sich DCs mit einer stärkeren *DC-SIGN* Expression besser mit dem HCMV Stamm TB40E infizieren lassen (s. Abbildung 34). Der Nachweis der Infektionseffizienz erfolgte mittels IE-Färbung (s. 3.3.6).

HCMV TB40E Infektionseffizienz

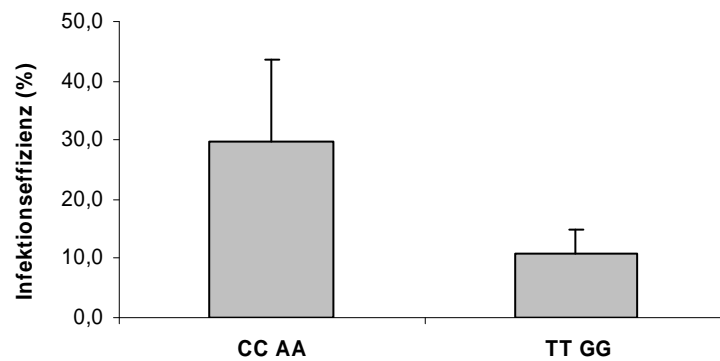


Abbildung 34: HCMV-TB40E Infektionseffizienz von DCs, die aus Blut von jeweils vier Personen mit der Allelkombination CC AA bzw. TT GG generiert wurden. Die Infektionen der DCs wurde, wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben, durchgeführt.

DCs mit der Allelkombination CC AA zeigten eine signifikant höhere Infizierbarkeit im Vergleich zu DCs mit der schwächeren *DC-SIGN* Expression ($p = 0.037$).

4.6 Interaktion von DCs und *A. fumigatus*

4.6.1 Untersuchungen zur Phagozytose von *A. fumigatus* durch DCs

Der zweite Teil dieser Dissertation beschäftigte sich mit der Interaktion von Immuneffektorzellen (DCs und Granulozyten) und dem ebenfalls nach allogener Stammzelltransplantation wichtigen Pathogen *A. fumigatus* (s. 2.2). Zunächst galt es die Frage zu beantworten, ob es eine direkte Interaktion zwischen Konidien und KS von *A. fumigatus* und DCs gibt. Hierfür wurde nach Co-Kultivierung der DCs mit den FITC-markierten Pilzen eine Cytospin-Präparation durchgeführt (s. Abbildung 35). Da *A. fumigatus* Hyphen aufgrund ihrer Größe und der Eigenschaft, sich zu einem Mycel zusammenzulagern, nicht in einheitlicher Konzentration pipettiert werden konnten, wurden sie nicht in die Untersuchungen einbezogen.

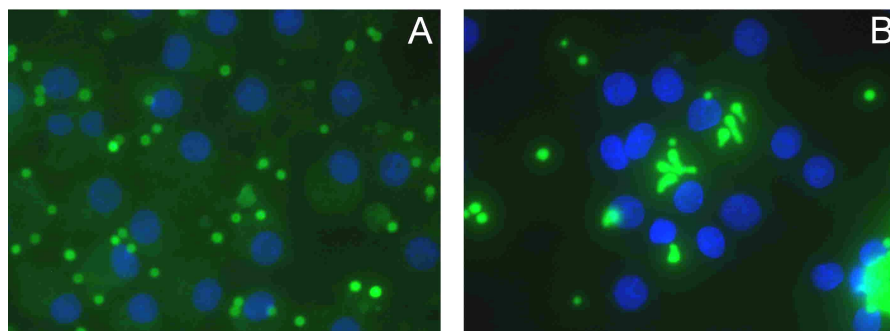


Abbildung 35: Phagozytose-Assay. DCs wurden für 60 min mit FITC-markierten Pilzen (A: *A. fumigatus* Konidien, B: *A. fumigatus* KS) co-kultiviert und nach einer Cytospin-Präparation mit DAPI gefärbt (s. 3.5.10).

Die derart hergestellten Präparate erlaubten keine eindeutige Aussage darüber, ob die Pilze phagozytiert wurden oder außerhalb der DCs lagen. Dennoch machte diese Art der Präparation die Größenverhältnisse zwischen DC und Pilz deutlich und gab diejenigen Formen von KS wieder, wie sie für alle weiteren Experimenten eingesetzt wurden. Eine zweite Art der Präparation, bei der die DCs ihre besondere Morphologie beibehielten, wurde dadurch erreicht, dass die Zellen auf Glasplättchen mit den Pilzen coinkubiert wurden (s. 3.5.10). Diesmal konnte der enge Kontakt zwischen Konidien und DCs nachgewiesen werden, da die Pilze vorwiegend an den Stellen zu finden waren, wo das Cytoskelett der DCs angefärbt war (s. Abbildung 36).

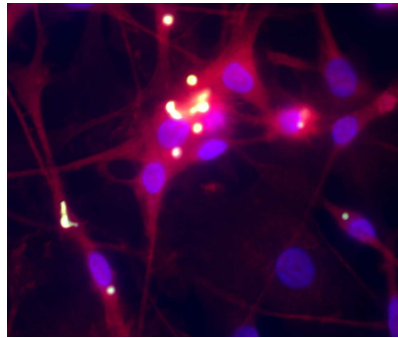


Abbildung 36: Phagozytose-Assay. DCs wurden für 60 min mit FITC-markierten Pilzen (*A. fumigatus* Konidien und KS) auf Glasplättchen co-kultiviert und das Cytoskelett mit Phalloidin-Alexa und die Zellkerne mit DAPI angefärbt (s. 3.5.10).

In Zusammenarbeit mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig konnte eine direkte Interaktion zwischen DCs und *A. fumigatus* KS mit dem *real-time* Mikroskop bestätigt werden (s. Abbildung 37). Dabei zeigte sich, dass DCs aktiv die Pilze aufsuchten und sich an diese anlagerten. Bereits nach 50 min war zu erkennen, dass die KS durch DCs angegriffen wurden.

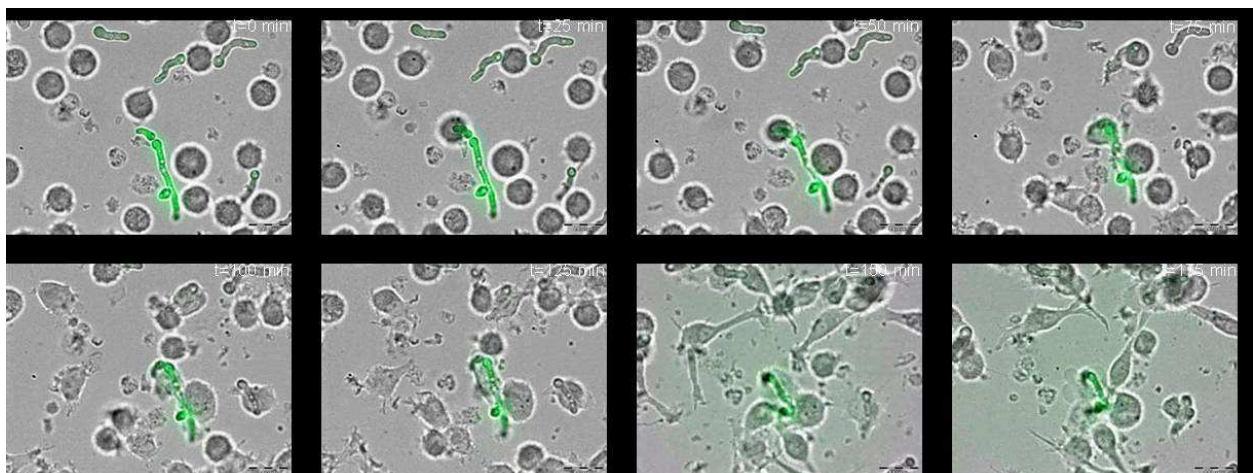


Abbildung 37: *Real-time* mikroskopische Aufnahmen nach Co-Kultivierung von DCs und FITC-gefärbten *A. fumigatus* KS über einen Zeitraum von 175 min. Die Bilder wurden freundlicherweise von Frau Dipl.-Biologin Iwona Wozniok (Universitätsklinikum Würzburg) im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig (AG Immundynamik, Dr. Matthias Gunzer) aufgenommen, die im Rahmen ihrer Arbeit eine Interaktion zwischen *A. fumigatus* und PMNs untersucht hat (Wozniok, 2007). Eine detaillierte Methoden-Anleitung findet sich in Gunzer *et al.*, 2004.

4.6.2 Microarray-Analysen nach Infektion von DCs mit *A. fumigatus* KS (unter immunsuppressiver Wirkung von Mycophenolat)

Eine von der Firma Novartis finanzierte Studie sollte klären, ob *ex vivo* generierte DCs durch MPA beeinflusst werden. Da es hierzu bislang keine Hinweise gab, wurde in Kooperation mit der Abteilung für Microarray-Analysen (Dr. Susanne Kneitz) ermittelt, ob es zu einer veränderten Genexpression nach MPA-Behandlung und gleichzeitiger Infektion mit *A. fumigatus* KS kommt.

Je 5×10^6 DCs wurden entweder ohne MPA, mit MPA (50 μg / 5 ml), mit *A. fumigatus* KS (5×10^6 / 5 ml) oder beides in Kombination für 6 h stimuliert. Anschließend wurde die Total-RNA isoliert (s. 3.6.1) und mittels Affymetrix-Chips das jeweilige Expressionsprofil bestimmt (s. 3.6.11). Das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm hatte dabei Werte zwischen 2,0 und 2,1 ergeben, was auf eine nur geringfügige Proteinverunreinigung der RNA zurückschließen ließ. Eine Qualitätsanalyse der RNA mittels *Bioanalyzer* (s. 3.6.11) ergab RIN-Werte (*RNA integrity number*) von 9,5 (Maximum: 10), was darauf hindeutete, dass die RNA von hervorragender Beschaffenheit war (s. Abbildung 38).

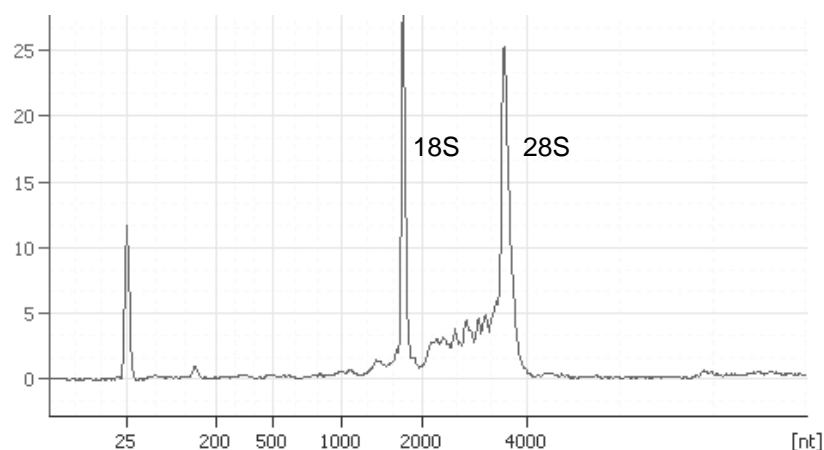


Abbildung 38: Qualitätsanalyse der für die Microarray-Analyse verwendeten RNA, die aus DCs isoliert wurde. Im Histogramm ist auf der x-Achse die Anzahl an Nt der RNA aufgetragen, auf der y-Achse die gemessene Absorption während der elektrophoretischen Auftrennung, die nach der Größe der RNA erfolgte. Am *Bioanalyzer* waren zwei saubere Peaks (bei 2.000 und 4.000 Nt) zu sehen, die die 18S und 28S rRNA repräsentierten.

Im Durchschnitt wurden 500 ng / μl an RNA aus 5×10^6 Zellen isoliert (Gesamtvolumen: 35 μl). Da für die Markierungsreaktion 2 μg / μl benötigt wurden, erfolgte vor der Biotin-Markierungsreaktion und Chip-Hybridisierung eine RNA-Amplifikation mit dem *One Cycle Labelling Kit* (Affymetrix).

Von den 47.400 Transkripten des *Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays* waren in DCs im Durchschnitt ca. 35% exprimiert, die restlichen 65% hingegen nicht. Tabelle 31 gibt einen Überblick über die Anzahl an differentiell exprimierten Genen beim Vergleich der verschiedenen experimentellen Ansätze.

Spender 1			
Vergleich		4 fache Expression	2 fache Expression
unstimuliert	MPA	0	27
unstimuliert	<i>A. fumigatus</i>	504	2867
unstimuliert	MPA + <i>A. fumigatus</i>	570	2915
Spender 2			
Vergleich		4 fache Expression	2 fache Expression
unstimuliert	MPA	0	7
unstimuliert	<i>A. fumigatus</i>	689	3140
unstimuliert	MPA + <i>A. fumigatus</i>	797	3054
Mittelwert Spender 1 und Spender 2			
Vergleich		4 fache Expression	2 fache Expression
unstimuliert	MPA	0	9
unstimuliert	<i>A. fumigatus</i>	590	2866
unstimuliert	MPA + <i>A. fumigatus</i>	689	2919

Tabelle 31: Anzahl an differentiell exprimierten Genen nach Stimulation von DCs mit MPA bzw. *A. fumigatus* KS.

Die Behandlung von DCs mit MPA führte zu keiner starken Veränderung des Expressionsprofils. Lediglich 27 Gene bei Spender 1 und sieben Gene bei Spender 2 schienen differentiell reguliert zu sein. Bei näherer Betrachtung fiel auf, dass hierbei nur drei Gene (*solute carrier family 16 member 10*, *SLC16A10*, *inhibin beta A*, *INHBA* und ein unbekanntes Gen) eine Übereinstimmung zwischen Spender 1 und Spender 2 zeigten.

Nach Infektion von DCs mit *A. fumigatus* KS waren 504 Gene bei Spender 1 (bzw. 689 Gene bei Spender 2) mit einer 4fachen Veränderung reguliert, bei zusätzlicher Behandlung mit MPA 570 bzw. 797 Gene. Dabei wurden 473 (bzw. 601) Gene gefunden, die in beiden Ansätzen (*A. fumigatus*, als auch MPA + *A. fumigatus*) eine über 4fache Regulation zeigten. Obgleich der Eindruck entstand, dass MPA die Pilz-induzierte Genexpression verstärkte, wurde eine Übereinstimmung lediglich für 21 Gene (darunter *Thrombospondin 1*, *THBS1*) gefunden, die sowohl bei Spender 1 und Spender 2 durch *A. fu-*

migatus + MPA verstärkt exprimiert waren im Vergleich zu Zellen, die nur in Kontakt mit dem Pilz standen. Da eine Literaturrecherche keinen vernünftigen Zusammenhang zur Immunsuppression ergab, wurde geschlussfolgert, dass MPA keinen, oder allenfalls sehr geringen Einfluss auf die Genexpression von DCs hatte.

Beim Vergleich zwischen unbehandelten und mit *A. fumigatus* KS stimulierten Zellen wurden 590 Gene (Mittelwert der Signal log ratios von Spender 1 und 2) gefunden, die eine 4fache Veränderung ihrer Expression aufwiesen. Diese 590 ließen sich in verschiedene Gruppen (Cytokine, Immunrezeptoren, etc.) einteilen (s. Tabelle 32). Der komplette Datensatz kann bei *Gene Expression Omnibus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) unter der *Accession number* GSE6965 abgerufen werden.

	ACCNUM	Gen-Name	Symbol	Signal log Ratio	Expression	t-Test	p-Wert	
C-C-motif Chemokine	NM_004591	<i>Chemokin (C-C motif) Ligand 20</i>	<i>CCL20</i>	-6,86	950,8	-51,3	3,48E-06	↑
	AF043341	<i>Chemokin (C-C motif) Ligand 5</i>	<i>CCL5</i>	-3,39	29,5	-13,3	1,03E-03	↑
	NM_002983	<i>Chemokin (C-C motif) Ligand 3</i>	<i>CCL3</i>	-1,79	6,0	-5,3	3,00E-02	↑
	NM_002984	<i>Chemokin (C-C motif) Ligand 4</i>	<i>CCL4</i>	-1,75	5,8	-5,0	3,79E-02	↑
	NM_002990	<i>Chemokin (C-C motif) Ligand 22</i>	<i>CCL22</i>	-1,73	5,7	-7,5	9,47E-03	↑
C-X-C-motif Chemokine	NM_001511	<i>Chemokin (C-X-C motif) Ligand 1</i>	<i>CXCL1</i>	-5,17	176,6	-16,3	4,22E-04	↑
	NM_002090	<i>Chemokin (C-X-C motif) Ligand 3</i>	<i>CXCL3</i>	-5,00	148,6	-20,3	1,82E-04	↑
	M57731	<i>Chemokin (C-X-C motif) Ligand 2</i>	<i>CXCL2</i>	-4,81	122,5	-23,1	9,55E-05	↑
	AK026546	<i>Chemokin (C-X-C motif) ligand 5</i>	<i>CXCL5</i>	-3,49	32,9	-8,9	5,15E-03	↑
	AF043337	<i>Interleukin 8</i>	<i>IL-8</i>	-3,04	20,9	-25,9	6,37E-05	↑
	NM_001565	<i>Chemokin (C-X-C motif) Ligand 10</i>	<i>CXCL10</i>	-1,94	6,9	-2,5	2,65E-01	↑
Interleukine, chemokine	M11734	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>	<i>GMCSF</i>	-5,10	164,6	-36,4	1,47E-05	↑
	M15329	<i>Interleukin 1 alpha</i>	<i>IL-1α</i>	-5,00	149,1	-18,9	2,30E-04	↑
	NM_000576	<i>Interleukin 1 beta</i>	<i>IL-1β</i>	-4,86	128,8	-26,0	6,37E-05	↑
	NM_002187	<i>Interleukin 12p40</i>	<i>IL-12</i>	-4,84	126,2	-15,1	6,47E-04	↑
	NM_000594	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	<i>TNF-α</i>	-4,36	78,6	-22,5	1,06E-04	↑
	NM_000600	<i>Interleukin 6</i>	<i>IL-6</i>	-3,67	39,4	-4,8	4,09E-02	↑
	BE563442	<i>Interleukin 1 Rezeptor Antagonist</i>	<i>IL1RN</i>	-2,90	18,1	-9,4	4,27E-03	↑
	U22386	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>	<i>MCSF</i>	-2,59	13,3	-6,9	1,22E-02	↑
	NM_016584	<i>Interleukin 23</i>	<i>IL-23</i>	-2,09	8,1	-6,2	1,86E-02	↑
NM_000572	<i>Interleukin 10</i>	<i>IL-10</i>	-1,32	3,8	-3,1	1,58E-01	↑	

Immunrezeptoren	AF015524	<i>Chemokine (C-C motif) receptor-like 2</i>	<i>CCRL2</i>	-2,78	16,1	-13,2	1,06E-03	↑
	NM_001561	<i>Tumor necrosis factor Rezeptor 9</i>	<i>TNFRSF9</i>	-2,56	12,9	-18,6	2,53E-04	↑
	NM_000417	<i>Interleukin 2 Rezeptor, alpha</i>	<i>IL2RA</i>	-2,30	9,9	-11,3	2,05E-03	↑
	NM_002852	<i>Pentraxin-3</i>	<i>PTX-3</i>	-2,02	7,5	-6,3	1,74E-02	↑
	NM_002185	<i>Interleukin 7 Rezeptor</i>	<i>IL7R</i>	-1,97	7,2	-2,6	2,42E-01	↑
	AJ277151	<i>Tumor necrosis factor Rezeptor 4</i>	<i>TNFRSF4</i>	-1,92	6,8	-18,15	2,84E-04	↑
	AF056979	<i>Interferon gamma Rezeptor 1</i>	<i>IFNGR1</i>	1,75	5,7	15,1	6,47E-04	↓
	L01639	<i>Chemokin (C-X-C motif) Rezeptor 4</i>	<i>CXCR4</i>	-1,73	5,6	-9,3	4,40E-03	↑
	NM_003264	<i>Toll-like Rezeptor 2</i>	<i>TLR2</i>	-1,58	4,9	-4,6	4,69E-02	↑
	NM_001838	<i>Chemokin (C-C motif) Rezeptor 7</i>	<i>CCR7</i>	-1,50	4,5	-5,3	3,03E-02	↑
	AF117297	<i>Tumor necrosis factor Rezeptor 18</i>	<i>TNFRSF18</i>	-1,44	4,2	-6,7	1,40E-02	↑
	NM_138557	<i>Toll-like Rezeptor 4</i>	<i>TLR4</i>	1,44	4,2	9,1	4,91E-03	↓
Co-stimulatoren	NM_001250	<i>CD40</i>	<i>CD40</i>	-1,62	5,0	-3,1	1,64E-01	↑
	NM_004233	<i>CD83</i>	<i>CD83</i>	-1,56	4,8	-10,3	2,84E-03	↑
	BC042665	<i>CD80</i>	<i>CD80</i>	-1,31	3,7	-9,0	4,95E-03	↑
	L25259	<i>CD86</i>	<i>CD86</i>	-1,16	3,2	-5,5	2,64E-02	↑
Prostaglandine	NM_000963	<i>Prostaglandin-endoperoxid Synthase 2</i>	<i>PTGS2</i>	-5,98	396,5	-29,1	4,55E-05	↑
	AI675173	<i>Prostaglandin E Rezeptor 4</i>	<i>PTGER4</i>	-2,06	7,8	-3,1	1,60E-01	↑
	NM_000956	<i>Prostaglandin E Rezeptor 2</i>	<i>PTGER2</i>	-1,64	5,2	-5,7	2,38E-02	↑
Immun Transkription	AB037925	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta</i>	<i>NFKBIZ</i>	-4,69	109,4	-13,5	9,85E-04	↑
	NM_002908	<i>v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog</i>	<i>REL</i>	-3,00	20,1	-8,0	7,43E-03	↑
	M55643	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>	<i>NFKB1</i>	-2,38	10,7	-16,5	4,05E-04	↑
	AI078167	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide</i>	<i>NFKBIA</i>	-1,74	5,7	-9,9	3,29E-03	↑

Matrix- metallopro- teinasen	NM_002425	<i>Matrix metalloproteinase 10</i>	<i>MMP10</i>	-4,84	126,8	-37,0	1,47E-05	↑
	NM_002421	<i>Matrix metalloproteinase 1</i>	<i>MMP1</i>	-4,06	57,9	-7,4	9,93E-03	↑
	U38321	<i>Matrix metalloproteinase 19</i>	<i>MMP19</i>	-2,88	17,8	-3,4	1,25E-01	↑
	NM_004994	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>	<i>MMP9</i>	-2,08	8,0	-4,8	4,24E-02	↑
Zell- adhäsion	NM_000201	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	<i>ICAM1</i>	-2,28	9,8	-5,7	2,33E-02	↑
	NM_021101	<i>Claudin 1</i>	<i>CLDN1</i>	-2,07	7,9	-3,1	1,64E-01	↑
	NM_002999	<i>Syndecan 4</i>	<i>SDC4</i>	-1,54	4,6	-12,9	1,15E-03	↑
Cytoskelett / Phagozytose	AY007161	<i>EH-domain containing 1</i>	<i>EHD1</i>	-2,42	11,2	-12,4	1,39E-03	↑
	NM_000422	<i>Keratin 17</i>	<i>KRT17</i>	-1,62	5,0	-3,4	1,31E-01	↑
	NM_006572	<i>Guanine nucleotide binding protein, alpha 13</i>	<i>GNA13</i>	-1,40	4,1	-5,1	3,56E-02	↑
	AI754416	<i>CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3</i>	<i>CDC42EP3</i>	-0,96	2,6	-3,2	1,46E-01	↑
	NM_017817	<i>RAB20, member RAS oncogene family</i>	<i>RAB20</i>	-0,93	2,5	-4,5	5,31E-02	↑
	NM_023009	<i>MARCKS-like 1</i>	<i>MARCKSL1</i>	-0,88	2,4	-6,8	1,35E-02	↑
	U34690	<i>Coronin, actin binding protein, 1A</i>	<i>CORO1A</i>	0,96	2,6	2,0	4,19E-01	↓
	AI679268	<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1</i>	<i>PIK3R1</i>	1,40	4,1	6,0	2,04E-02	↓

Tabelle 32: Auswahl an interessanten, differentiell exprimierten Genen, die nach sechsständiger Co-Kultivierung von DCs mit *A. fumigatus* KS hoch- bzw. runterreguliert waren. Aus den Mittelwerten der Signal log ratios von 2 DC-Spendern wurde errechnet ($e^{\text{Signal log ratio}}$), um welchen Faktor ein Gen stärker (↑) oder schwächer (↓) exprimiert war. Der komplette Datensatz kann bei *Gene Expression Omnibus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) unter der *Accession number* GSE6965 abgerufen werden.

Die Klassifikation der 590 differentiell exprimierten Gene nach *A. fumigatus* Infektion mit Hilfe der *Gene Ontology tree machine* (GOTM; <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>; Zhang *et al.*, 2004) machte deutlich, dass die Gegenwart von *A. fumigatus* weitreichende Veränderungen des Expressionsprofils von DCs nach sich zog. Es waren vor allem Gene differentiell reguliert, von denen bekannt ist, dass sie an Vorgängen der Signaltransduktion, Pathogen-Abwehr, Immunantwort, aber auch Cytoskelett-Organisation (*KRT17*, *GNA13*) und Phagozytose (*RAB20*, *MARCKSL1*, *CORO1A*, *EHD1*) beteiligt sind.

Das Gen, das die höchste Expression zeigte, war *CCL20*. Des Weiteren wurde eine Hochregulation von Cytokinen (*TNF- α* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-12*), Chemokinen (*IL-8*, *CXCL10*), Co-stimulatorischen Molekülen (*CD40*, *CD80*, *CD83*, *CD86*), Prostaglandin Synthese Genen (*PTGS2*) und Genen, die an der Erkennung von Pilzen beteiligt sind (*PTX-3*, *TLR2*), beobachtet. Die Ausreifung von DCs durch *A. fumigatus* wurde mittels Durchflusszytometrie bestätigt (s. 4.6.3), die Expression ausgewählter Cytokine und Rezeptoren mittels qRT-PCR (s. 4.6.4).

4.6.3 Einfluss von Immunsuppressiva auf die Reifung von DCs

Patienten nach Stammzelltransplantation werden zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen mit Immunsuppressiva behandelt, wodurch die Funktion des neuen Immunsystems unterdrückt wird. Neben den bekannten Wirkungen von Sandimmun (Cyclosporin A), Fortecortin (Dexamethason), Solu-Decortin, CellCept, MPA und RAD (s. 3.2.6) sollte hier untersucht werden, ob DCs in ihrer Fähigkeit zur Reifung negativ beeinflusst werden.

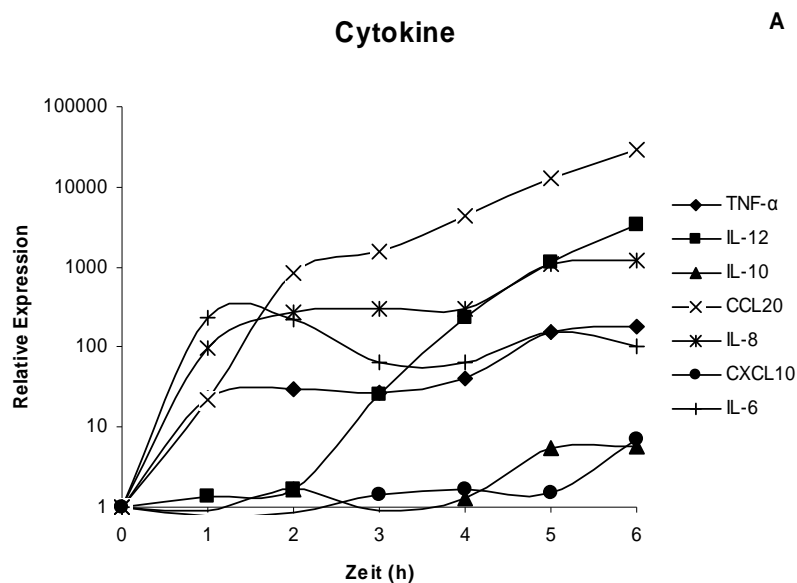
Die besagten Immunsuppressiva wurden in einer hohen Konzentration von 1 μg und 10 μg zu 1×10^6 DCs zugegeben und die Expression der Co-stimulatorischen Moleküle nach 2 d am FACS analysiert. Es zeigte sich, dass keines einen deutlichen stimulierenden oder inhibierenden Einfluss hatte. Ferner wurde keine Ausreifung (CD83) und auch keine Rückdifferenzierung zu Monozyten (CD14) induziert (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die Reifung von DCs durch Immunsuppressiva beeinflusst wird, wurden DCs gleichzeitig mit Immunsuppressiva (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Erwartungsgemäß bewirkte LPS eine Hochregulation der Expression der Co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83 und CD86, die nicht signifikant durch eines der Immunsuppressiva inhibiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes wurde die durch *A. fumigatus* KS induzierte Reifung, in Kombination mit den besagten Immunsuppressiva, überprüft. Diese Experimente wurden mit Ethanolinaktivierten Pilzen durchgeführt, da eine Stimulationszeit von 48 h gewählt wurde (s. 3.4). Es wurde deutlich, dass *A. fumigatus* KS zur Ausreifung von DCs führte, die allerdings schwächer ausfiel als mit der Stimulation durch LPS. Keines der Immunsuppressiva veränderte die Expression der Co-stimulatorischen Molekülen (Daten nicht gezeigt).

4.6.4 Zeitabhängige Co-Kultivierung von DCs mit *A. fumigatus* KS

Die Rekrutierung und Aktivierung anderer Immuneffektorzellen durch DCs ist ein zentraler Schritt in der Immunabwehr von Pathogenen. Nachdem die Microarray-Daten (s. 4.6.2) gezeigt hatten, dass ein breites Spektrum an Cytokinen durch den Kontakt mit *A. fumigatus* KS exprimiert wird, wurde das Expressionsprofil ausgesuchter Cytokine (*CCL20*, *CXCL10*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p40*, *TNF- α*) und interessanter Immunrezeptoren (*TLR2*, *TLR4*, *Dectin-1* und *PTX-3*) in Abhängigkeit der Zeit untersucht. Zu diesem Zweck wurden 1×10^6 DCs mit *A. fumigatus* KS (MOI=1) infiziert und nach RNA-Isolation und cDNA Synthese die Expression des jeweiligen Gens zum jeweiligen Zeitpunkt mit dem *Light Cycler* bestimmt (s. Abbildung 39).



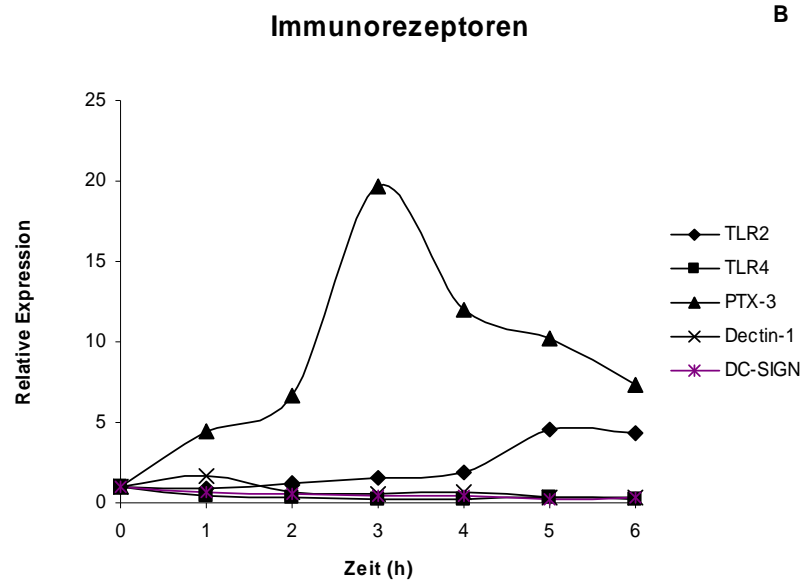


Abbildung 39: Zeitliche Expression (1 h - 6 h) ausgesuchter Cytokine (A) und Immunrezeptoren (B) nach Infektion von 1×10^6 DCs mit *A. fumigatus* KS (MOI=1). Die Expressionen wurden mit Hilfe der qRT-PCR ermittelt (s. 3.6.4). Das Ergebnis ist repräsentativ für drei verschiedene DC-Spender.

In Übereinstimmung zu den Microarrays wurde für *CCL20* die höchste Expression (>10.000 fach) aller analysierten Gene beobachtet. Dabei war eine stetige Zunahme der Expression in Abhängigkeit der Zeit zu sehen. Auch *IL-6*, *IL-8* und *TNF- α* zeigten bereits nach 1-2 h eine 100 bis 1.000 fache Erhöhung der Expression, wohingegen die Expression von *CXCL10* und *IL-10* erst nach 5 h 10 fach erhöht war. Interessanterweise wurde *IL-12* zeitverzögert (frühestens nach 2 h Co-Kultivierung) exprimiert und erreichte nach 6 h eine mehr als 1.000 fache Expression.

Was die Expression von *PTX-3* betraf, so war *PTX-3* nach 3 h Co-Kultivierung am stärksten exprimiert, zeigte nach 6 h aber immer noch eine 8 fach erhöhte Expression. Wie bereits bei den Array-Analysen konnte bestätigt werden, dass durch den Kontakt mit Pilz *TLR2* hoch- und *TLR4* runterreguliert wurden. Eine leichte Runterregulation wurde auch für *Dectin-1* beobachtet.

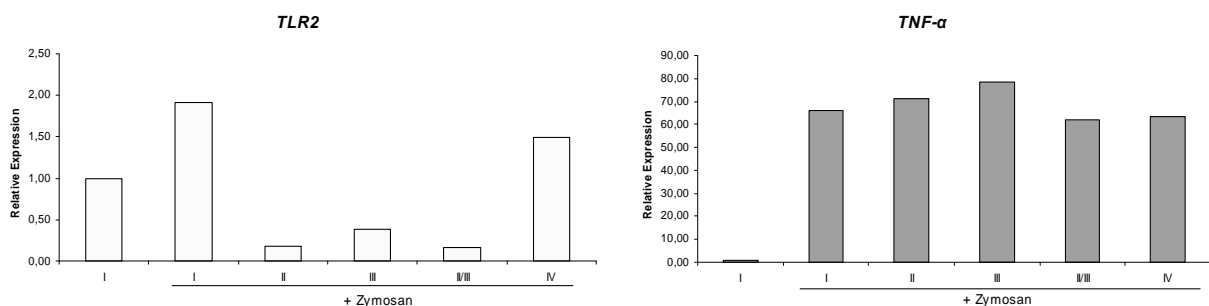
4.7 Identifikation eines Rezeptors für *A. fumigatus* auf DCs

4.7.1 Untersuchung der durch Zymosan vermittelten Immunantwort nach TLR2 siRNA Transfektion

Die große Anzahl an Cytokin- und Chemokingenen, die von DCs nach Kontakt mit Pilzen exprimiert wurden, warf die Frage auf, über welche Rezeptoren und Signalwege deren Expression induziert wird. Im Folgenden sollte daher geklärt werden, ob mit Hilfe von siRNAs und dem Einsatz von blockierenden Antikörpern derartige Immunrezeptoren auf DCs identifiziert werden können, die an der Erkennung von *A. fumigatus* beteiligt sind.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Expression von *TNF- α* , *IL-12* und *IL-10* vorwiegend über TLR induziert wird (s. 2.4.3). Aufgrund der Beobachtung, dass die beiden siRNAs gegen TLR2 eine signifikante Reduktion der Expression zeigten (s. 4.3.2), galt es zu klären, ob es mittels siRNA möglich ist, die durch einen beschriebenen TLR2 Liganden ausgelöste Aktivierung abzuschwächen.

Zymosan ist eine Hefepilzpräparation, die vorwiegend β -Glucane enthält. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von Makrophagen durch Zymosan über TLR2 erfolgt (Underhill *et al.*, 1999). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es mit Hilfe der RNAi möglich ist, eine Aktivierung von TLR2 durch Zymosan aufzuzeigen.



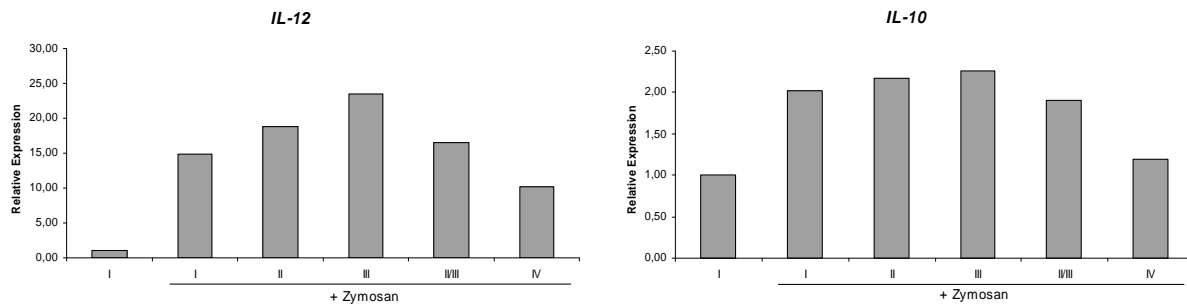


Abbildung 40: Relative Expression von *TLR2*, *TNF- α* , *IL-12* und *IL-10*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit *TLR2* siRNA (II, III) oder mit der non-silencing Kontrolle (IV) transfiziert. Im Ansatz II/III wurde jeweils die Hälfte der ursprünglich verwendeten Menge von beiden siRNAs eingesetzt (66,5 nM anstelle von 133 nM). 24 h nach Transfektion wurde für 6 h mit 10 μ g Zymosan stimuliert.

Der Einsatz der *TLR2* siRNAs führte, im Vergleich zu den Ansätzen ohne siRNA bzw. mit der Kontroll-siRNA, zu einer Reduktion der Expression um 90% [87-94%] (II) bzw. 83% [77-86%] (III). Erwartungsgemäß wurde durch die Stimulierung mit Zymosan die Expression von *TNF- α* und *IL-12* induziert, wobei die Induktion in den Ansätzen mit *TLR2* siRNA nicht geringer ausfiel. Auch ein Heraufsetzen der siRNA Inkubationszeit von 24 h auf 48 h konnten keinen Nachweis dafür erbringen, dass Zymosan DCs über den *TLR2*-Signalweg aktiviert (Daten nicht gezeigt).

4.7.2 Untersuchung der durch *A. fumigatus* vermittelten Immunantwort nach *TLR2* siRNA Transfektion

Für PBMC's wurde von Netea *et al.* (2004) gezeigt, dass die Aktivierung durch *A. fumigatus* Hyphen über *TLR2* erfolgt. Ob dasselbe auch für *in vitro* generierte DCs zutrifft, sollte durch den Einsatz der beiden *TLR2* siRNAs und der Stimulierung mit *A. fumigatus* Keimschläuchen nachgeprüft werden. Neben der Expression von *TLR2* wurde auch die Expression von Genen (*TNF- α* , *IL-12*, *IL-10*) untersucht, die im Zusammenhang mit dem *TLR2* Signalweg standen.

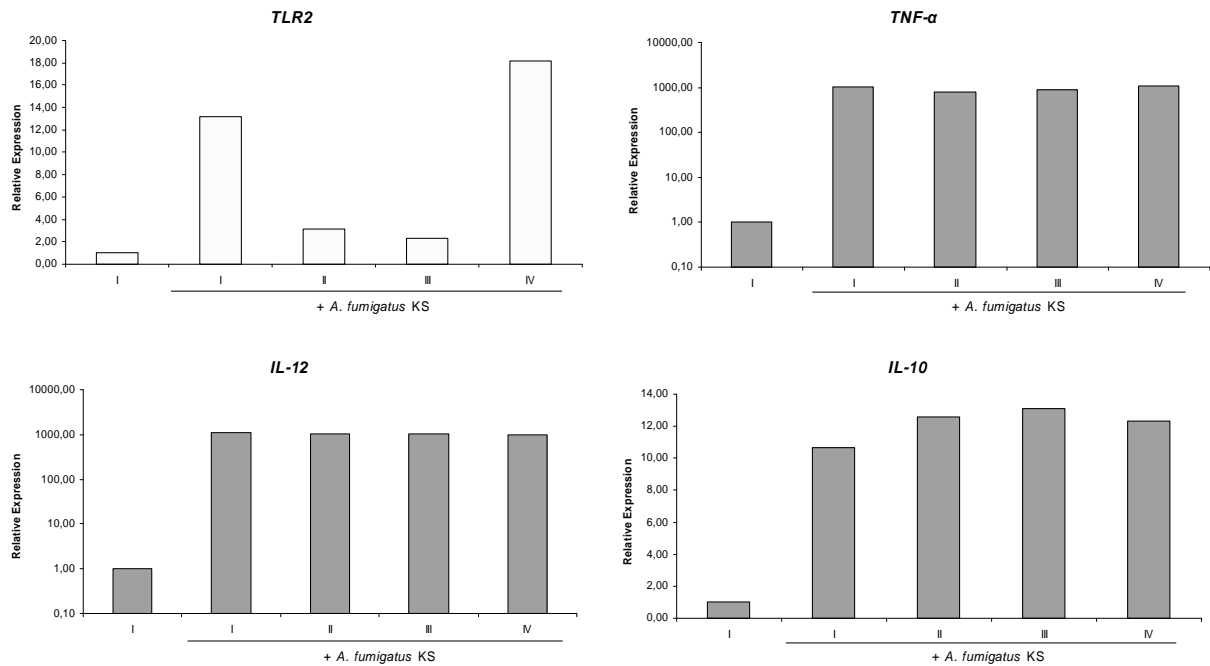


Abbildung 41: Relative Expression von *TLR2*, *TNF-α*, *IL-12* und *IL-10*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit *TLR2* siRNA (II, III) oder mit der non-silencing Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 1×10^6 *A. fumigatus* KS für 6 h stimuliert.

Der Einsatz der *TLR2* siRNA führte zu einer Reduktion der *TLR2* Expression um 82% [72-94%] (II) bzw. 85% [81-88%] (III). Die Expression von *TLR4* wurde durch die *TLR2* siRNA nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Durch die Stimulierung mit *A. fumigatus* KS wurde die *TLR2* Expression erhöht, die in den Ansätzen mit der siRNA deutlich geringer ausfiel. Gleichzeitig wurde durch *A. fumigatus* die Expression von *TNF-α*, *IL-12* und *IL-10* induziert. Allerdings zeigte sich, dass es nach 24 h *TLR2* siRNA Behandlung und der Stimulierung für 6 h zu keiner reduzierten *TNF-α*, *IL-12* und *IL-10* Expression kam.

4.7.3 Untersuchung der durch LPS vermittelten Immunantwort nach *TLR4* siRNA Transfektion

Neben *TLR2* stand auch *TLR4* im Verdacht, an der Erkennung von *A. fumigatus* durch DCs beteiligt zu sein. In wie weit sich die Methode der RNAi dazu eignete, eine mögliche Interaktion mit *TLR4* aufzuzeigen, sollte im Folgenden geklärt werden. Wie in den bisherigen experimentellen Ansätzen wurden DCs mit *TLR4* siRNA für 24 h transfiziert und anschließend mit LPS stimuliert.

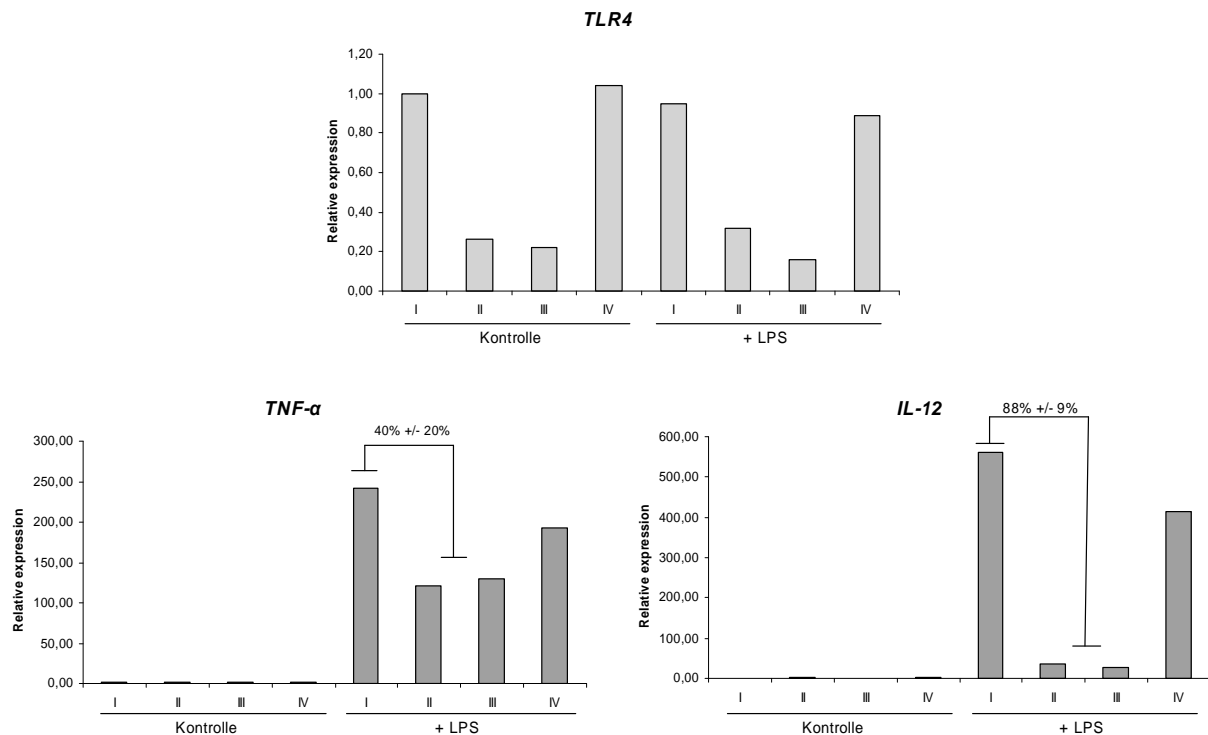


Abbildung 42: Relative Expression von *TLR4*, *TNF-α* und *IL-12*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit *TLR4* siRNA (II, III), mit beiden siRNAs (II/III) oder mit der *non-silencing* Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h später wurde mit 1 µg/ml ultrareinem LPS für 6 h stimuliert.

Mit Hilfe der verwendeten siRNAs konnte die Expression von *TLR4* deutlich herunterreguliert werden (*TLR4* siRNA 1: 82% [71-91%]; *TLR4* siRNA 2: 88% [78-94%]). LPS führte zu einer erhöhten Expression von *TNF-α* und *IL-12*. Nach siRNA Transfektion und LPS Stimulation war die Expression von *TNF-α* (40% +/- 20%; p=0.076) und *IL-12* (88 +/- 9%; p<0.01) im Gegensatz zum Ansatz mit der Kontroll siRNA signifikant erniedrigt. Somit konnte der Nachweis für einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von *TLR4* und der Induktion von *TNF-α* und *IL-12* nach LPS-Stimulation erbracht werden. Eine verringerte Cytokinsekretion ins Medium nach *TLR4* siRNA Transfektion und LPS Stimulation wurde auch mittels *TNF-α* (48 +/- 12%) und *IL-12* (60 +/- 22%) ELISA bestätigt.

4.7.4 Untersuchung der durch *A. fumigatus* vermittelten Immunantwort nach *TLR4* siRNA Transfektion

Die Vorexperimente mit *TLR4* siRNA und LPS-Stimulation gaben Anlass zu der Annahme, dass sich die Methode der RNAi dazu eignen sollte, eine mögliche Interaktion zwischen *TLR4* und *A. fumigatus* KS aufdecken zu lassen (s. 4.7.3). Wie bisher wurden

DCs mit siRNA transfiziert und nach 24 h mit *A. fumigatus* KS für 6 h stimuliert. Anschließend erfolgte wie gewohnt die Expressionskontrolle ausgesuchter Cytokine am *Light Cycler*.

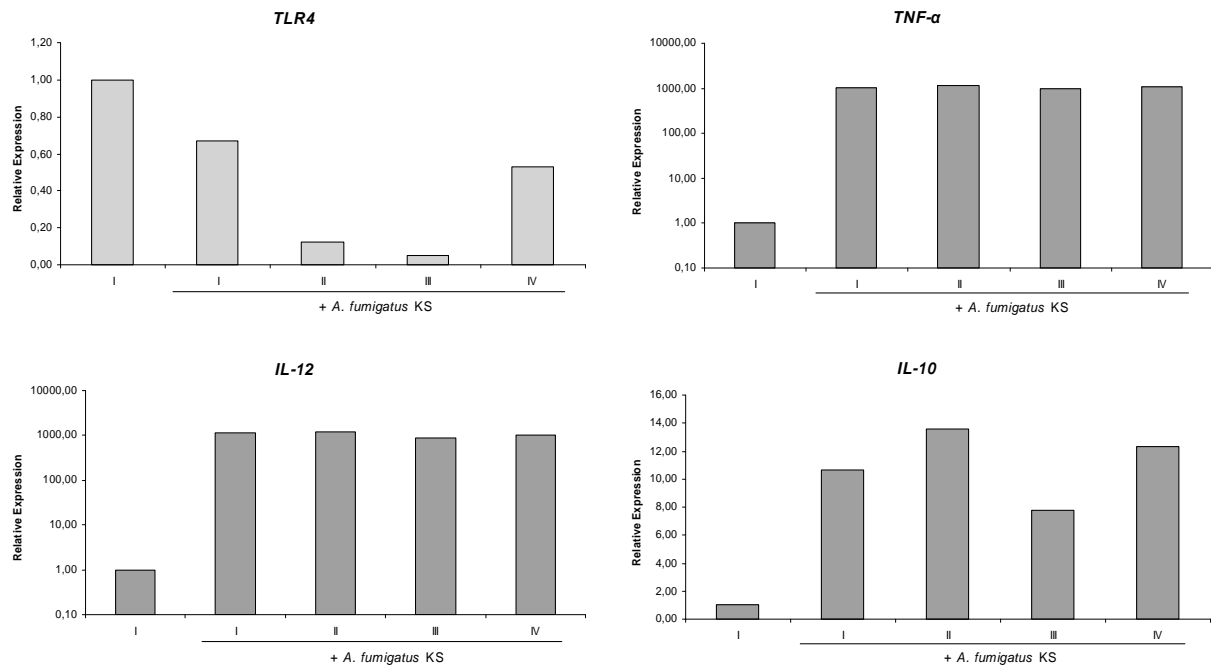


Abbildung 43: Relative Expression von *TLR4*, *TNF-α*, *IL-12* und *IL-10*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit *TLR4* siRNA (II, III) oder mit der non-silencing Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h später wurde mit 1 Mio *A. fumigatus* KS für 6 h stimuliert.

Mit beiden *TLR4* siRNAs konnte eine um 82% [72-95%] (II) bzw. 93% [89-98%] (III) reduzierte Expression herbeigeführt werden. Gleichzeitig blieb die *TLR2* Expression durch die *TLR4* siRNAs unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt).

A. fumigatus KS bewirkten, wie bereits bei der Stimulation mit LPS (s. 4.7.3), einen leichten Rückgang der Expression von *TLR4*. Wurden DCs anstelle von 6 h für 24 h mit *A. fumigatus* KS inkubiert, führte dies zu einem beinahe kompletten Rückgang der *TLR4* Expression (Daten nicht gezeigt).

Bei der Analyse von durch den TLR-Signalweg induzierten Cytokinen zeigte sich, dass es in den Ansätzen, die gleichzeitig mit siRNA behandelt und mit *A. fumigatus* KS stimuliert wurden, zu keiner reduzierten Expression von *TNF-α*, *IL-12* und *IL-10* kam.

4.7.5 Untersuchung der durch LPS, Zymosan und *A. fumigatus* vermittelten Immunantwort nach MyD88 siRNA Transfektion

Zur weiteren Bestätigung der Experimente mit TLR2 und TLR4 siRNA, sollte versucht werden, die Signaltransduktion durch den Einsatz einer siRNA gegen MyD88 zu inhibieren. Dazu wurden die DCs mit der MyD88 siRNA transfiziert und nach 24 h für einen Zeitraum von 6 h mit LPS, Zymosan und *A. fumigatus* KS stimuliert.

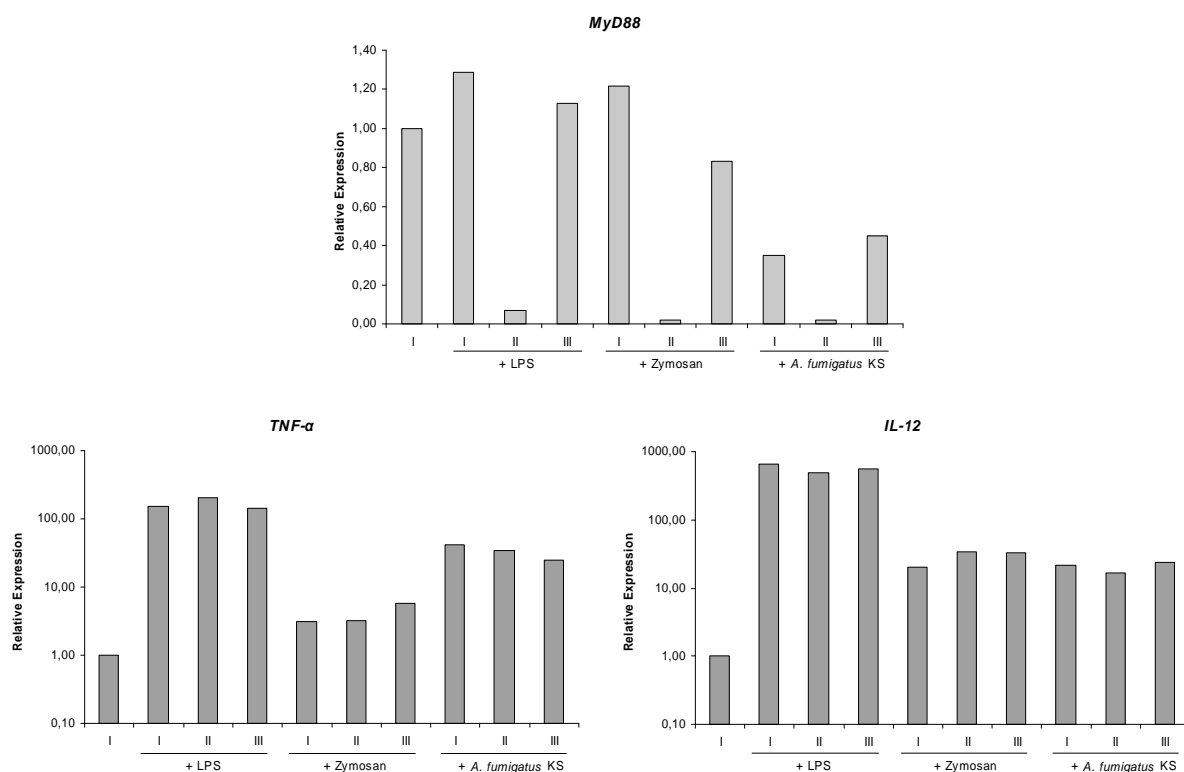


Abbildung 44: Relative Expression von *MyD88*, *TNF-α* und *IL-12*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit einer *MyD88* siRNA (II) oder mit der non-silencing Kontrolle (III) transfiziert. 24 h später wurde mit 10 µg Zymosan, 1 µg LPS oder mit 1 Mio *A. fumigatus* KS für 6 h stimuliert.

Die validierte siRNA gegen MyD88 verursachte einen starken *knock-down* von durchschnittlich 97% [95-99%] (II). Durch Stimulation mit Zymosan, LPS und *A. fumigatus* wurde die Expression von *TNF-α* und *IL-12* induziert. Allerdings wurde dabei keine signifikante Reduktion beobachtet, wenn zuvor die Expression von *MyD88* verringert war.

4.7.6 Untersuchung der durch *A. fumigatus* vermittelten Immunantwort nach Behandlung mit α -TLR2 bzw. α -TLR4 Antikörpern

Um den Beobachtungen aus den Abschnitten 4.7.2 und 4.7.4 weiter nachzugehen, sollte mit Antikörpern, die gegen TLR2 bzw. TLR4 gerichtet waren (s. 3.2.11), versucht werden, eine mögliche Signaltransduktion über diese Rezeptoren zu unterbinden. Bei der Durchführung des Experimentes wurden DCs vor der Stimulierung mit *A. fumigatus* KS für 30 min mit den TLR Antikörper inkubiert. Als Kontrolle wurde mit LPS oder Zymosan stimuliert.

Die verwendeten TLR Antikörper waren zu diesem Zeitpunkt bereits erfolgreich bei Granulozyten verwendet worden (s. 4.8.2). Nach der sechsständigen Stimulierung wurde die Menge an TNF- α und IL-12, die ins Medium abgegeben wurde, mittels ELISA (s. 3.8.1) ermittelt.

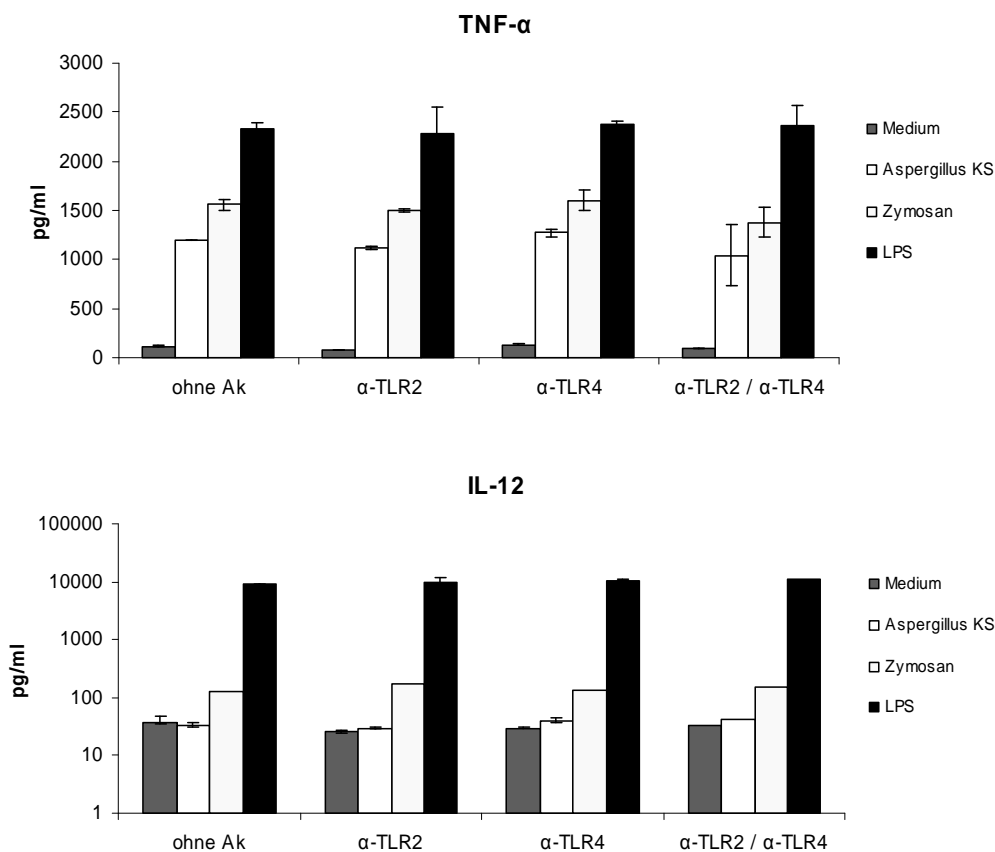
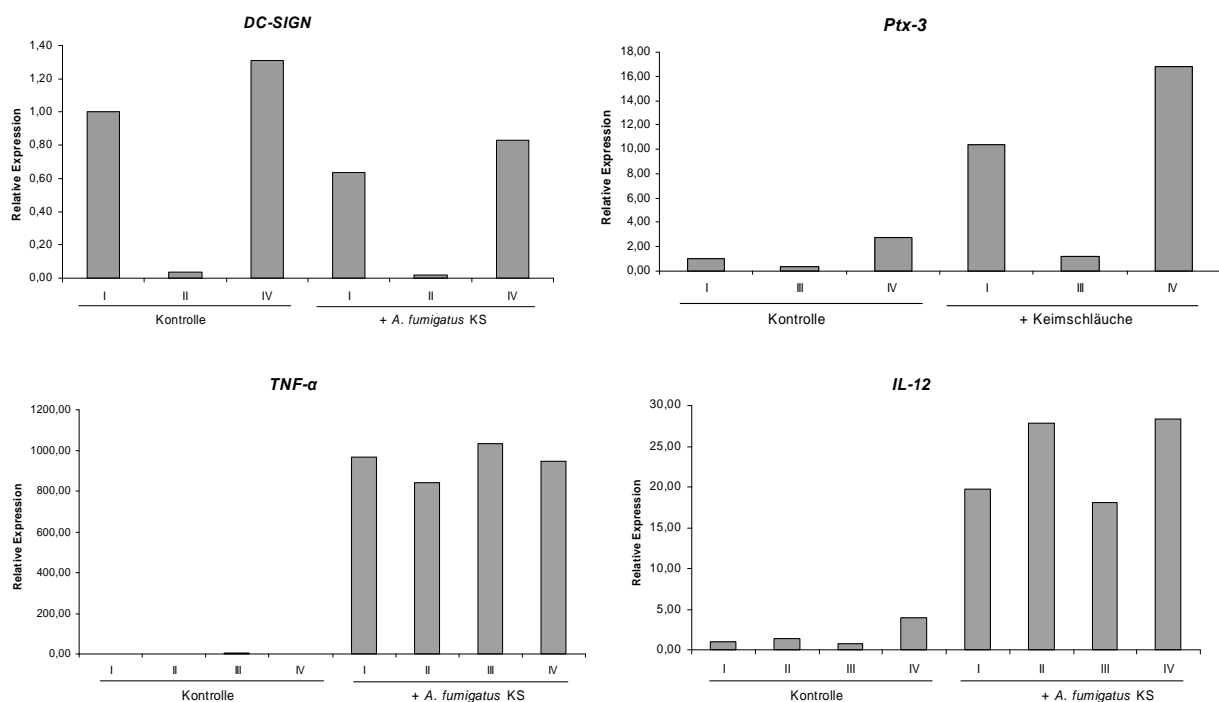


Abbildung 45: ELISA für IL-12 und TNF- α nach Stimulierung von DCs mit 1 Mio *A. fumigatus* KS, 10 μ g Zymosan oder 1 μ g LPS. Vor der sechsständigen Stimulierung wurden 1×10^6 Zellen entweder ohne Antikörper oder mit 2 μ g/ml α -TLR2 Ak, α -TLR4 Ak bzw. beide AK in Kombination für 30 min vorinkubiert.

Die Stimulation mit LPS und Zymosan führte zur Freisetzung von TNF- α und IL-12, die allerdings durch Antikörper-Zugabe nicht verringert wurde. Auch durch *A. fumigatus* KS wurde TNF- α induziert. Abermals konnte auch hier keine Verringerung durch Zugabe der beiden TLR Antikörper beobachtet werden. Daraus folgte, dass die verwendeten Antikörper eine mögliche Signaltransduktion über TLR2 bzw. TLR4 nicht verhinderten.

4.7.7 Untersuchung der durch *A. fumigatus* vermittelten Immunantwort nach PTX-3 und DC-SIGN siRNA Transfektion

Für TLR2 und TLR4 konnte in der vorliegenden Arbeit keine Interaktion mit *A. fumigatus* KS nachgewiesen werden. Somit lag der Verdacht nahe, dass DCs über andere Immunrezeptoren aktiviert werden (s. 2.5). Durch den Einsatz von siRNA (s. 3.2.10) sollte die Expression von *PTX-3* und *DC-SIGN* (*CD209*) reduziert werden, um anschließend die Cytokinantwort nach Zugabe von *A. fumigatus* KS näher zu untersuchen.



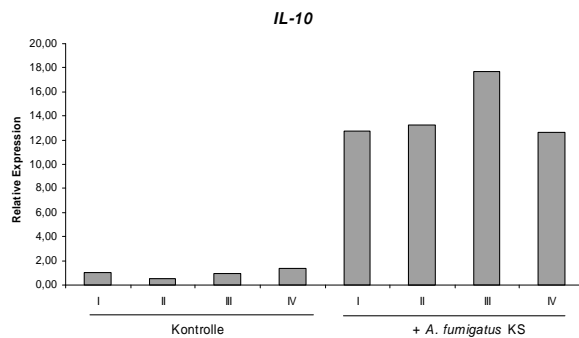


Abbildung 46: Relative Expression von *DC-SIGN*, *PTX-3*, *TNF- α* , *IL-12* und *IL-10*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit *DC-SIGN* siRNA (II), mit *PTX-3* siRNA (III) oder mit der *non-silencing* Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h später wurde mit 1 Mio *A. fumigatus* KS für 6 h stimuliert.

Mittels siRNA war es jeweils möglich, die Expression von *DC-SIGN* um 97% [95-99%] und *PTX-3* um 79% [67-93%] signifikant zu verringern. Insbesondere die siRNA gegen *DC-SIGN* hatte einen starken *knock-down*, mit einer 97%-igen Reduktion, zur Folge. Die sechsstündige Stimulation mit *A. fumigatus* KS führte zu einer erhöhten *PTX-3*, *TNF- α* , *IL-12* und *IL-10* Expression. Wenn die Zellen vorher mit siRNA transfiziert wurden, führte dies nicht gleichzeitig zu einer abgeschwächten Cytokinantwort. Dies bedeutete, dass *DC-SIGN* und *PTX-3* nicht an der Induktion von *TNF- α* , *IL-12* und *IL-10* beteiligt waren.

4.7.8 Untersuchung der durch Zymosan vermittelten Immunantwort nach Dectin-1 siRNA Transfektion

Neuere Untersuchungen gaben Anlass zu der Annahme, dass es sich bei *Dectin-1* (*CLEC7A*) um den gesuchten Rezeptor für Pilze handeln könnte, über den die Expression der pro-inflammatorischen Cytokine *TNF- α* und *IL-12* induziert wird (Brown *et al.*, 2003). Bereits 2002 wurde von Grunebach *et al.* gezeigt, dass die unterschiedlichen humanen DC-Populationen, im Gegensatz zu Monozyten, *Dectin-1* exprimieren.

Um herauszufinden, ob *Dectin-1* bei DCs tatsächlich der Rezeptor für Pilze ist, sollte durch den Einsatz der RNAi näher untersucht werden. Leider zeigten die zuerst eingesetzten siRNAs (*Dectin-1* siRNA 1 und siRNA 2) keinen *knock-down*, so dass zwei weitere siRNAs bei Qiagen bestellt wurden. Auch diese wurden auf ihre Funktionalität hin getestet, und es stellte sich heraus, dass lediglich die *Dectin-1* siRNA 3 (s. 3.2.10) eine deutliche Runterregulation ermöglichte (Daten nicht gezeigt). Folglich wurde diese für die weiteren Experimente verwendet.

Zunächst wurden 1×10^6 DCs mit der Dectin-1 siRNA 3 transfiziert und nach 24 h die Zellen für 6 h mit Zymosan stimuliert (s. Abbildung 47).

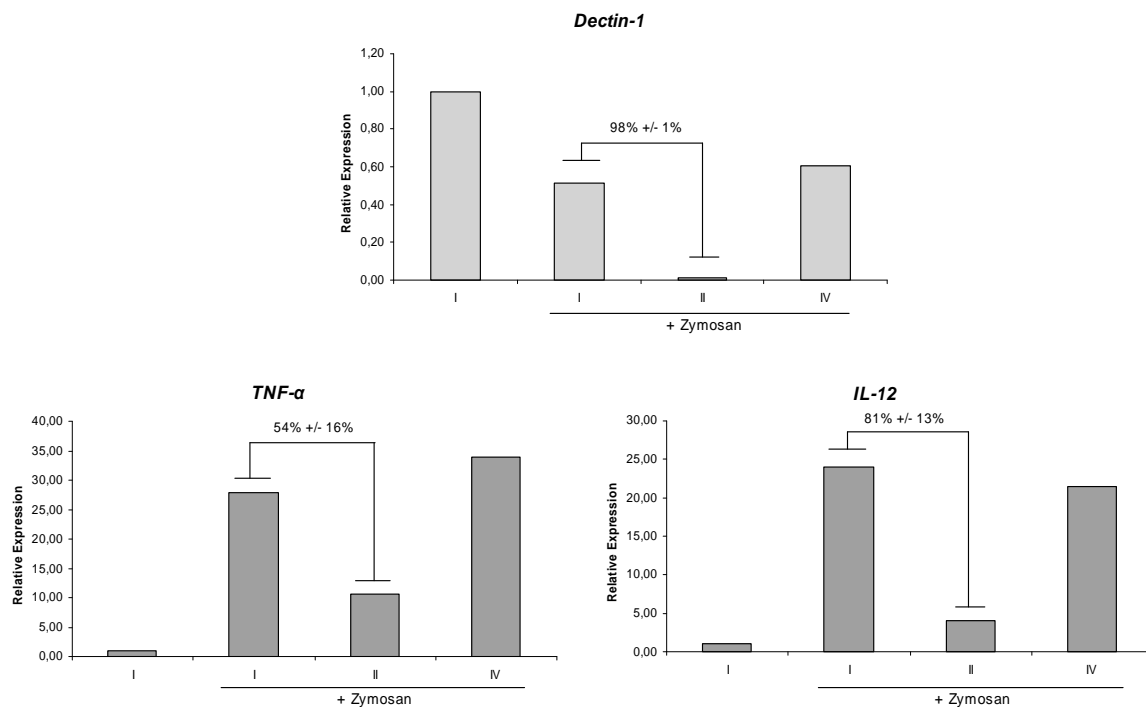


Abbildung 47: Relative Expression von *Dectin-1*, *TNF-α* und *IL-12*. 1×10^6 DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit Dectin-1 siRNA (II) oder mit der non-silencing Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde für 6 h mit $10 \mu\text{g}$ Zymosan stimuliert.

Der Einsatz der Dectin-1 siRNA 3 führte, im Vergleich zu den Ansätzen ohne siRNA (I) bzw. mit der Kontroll-siRNA (IV), zu einer Reduktion der Expression um ca. 98% +/- 1%. Erwartungsgemäß wurde durch die Stimulierung mit Zymosan die Expression von *TNF-α* und *IL-12* induziert. Aufgrund der Beobachtung, dass *TNF-α* (54% +/- 16%; $p=0.169$) und *IL-12* (81% +/- 13%; $p<0.01$) nach Dectin-1 siRNA Transfektion und Zymosan Stimulation verringert exprimiert waren, wurde geschlossen, dass Dectin-1 als Rezeptor für Zymosan fungiert. Dies bestätigte gleichzeitig die Experimente aus Abschnitt 4.7.1, bei denen keine Aktivierung von TLR2 durch Zymosan nachgewiesen werden konnte.

4.7.9 Rolle von Dectin-1 bei der Erkennung von *A. fumigatus* und *C. albicans*

Aufgrund der Untersuchungen des vorangegangenen Abschnittes, wurde als nächstes getestet, ob sich mit Hilfe der gut funktionierenden siRNA eine Aktivierung von DCs durch *A. fumigatus* KS über den Dectin-1 Rezeptor nachweisen lässt. In Analogie zu den bisherigen Experimenten wurden DCs mit Dectin-1 siRNA transfiziert und im Anschluss mit *A. fumigatus* KS co-kultiviert.

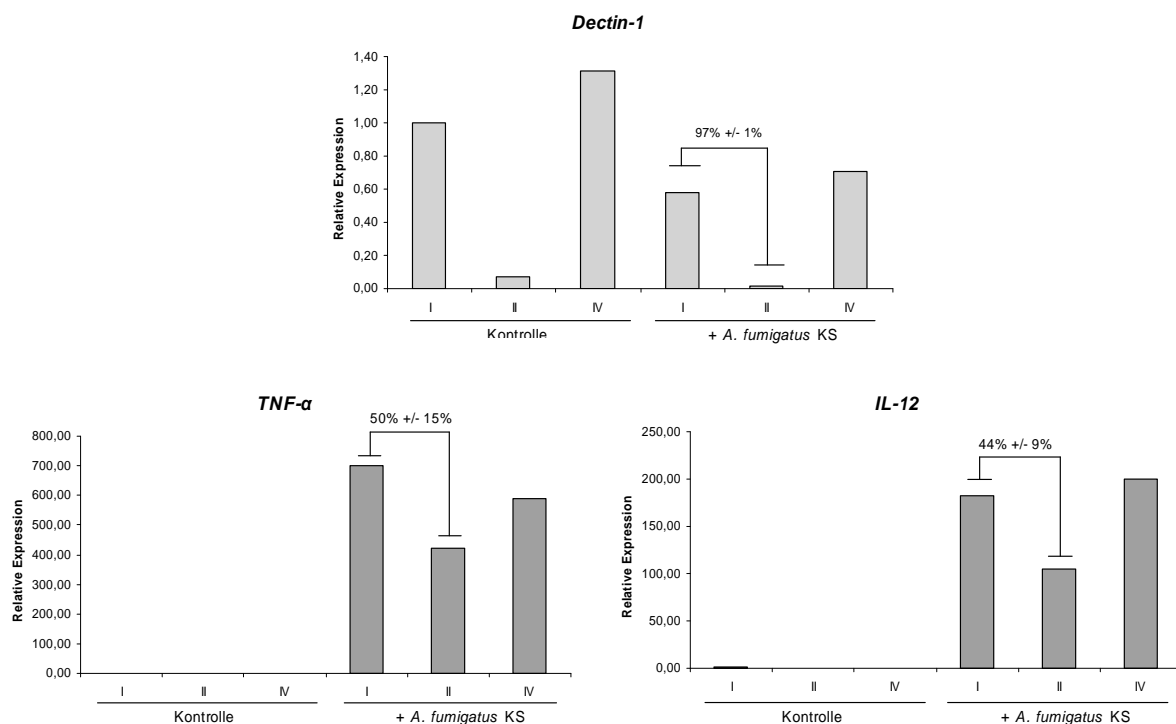


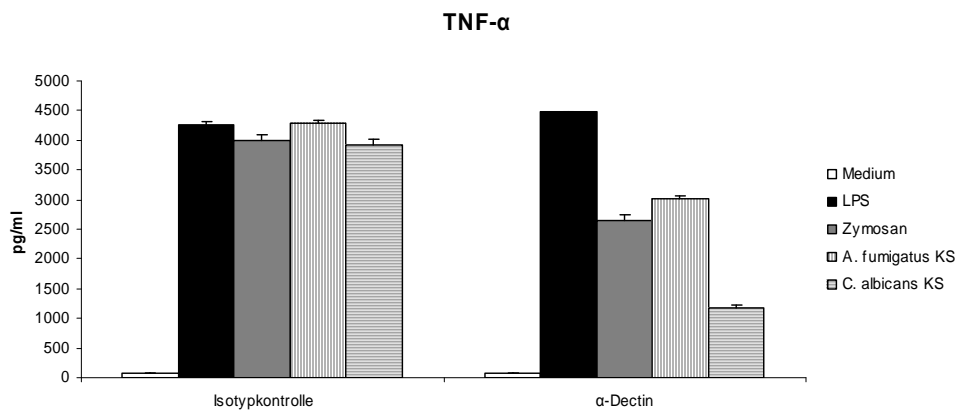
Abbildung 48: Relative Expression von *Dectin-1*, *TNF-α* und *IL-12*. 1×10^6 DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit Dectin-1 siRNA (II) oder mit der *non-silencing* Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde für 6 h mit 1 Mio *A. fumigatus* KS stimuliert.

Durch die Stimulierung mit *A. fumigatus* KS wurde die *Dectin-1* Expression leicht verringert. Gleichzeitig wurde durch *A. fumigatus* die Expression von *TNF-α* und *IL-12* induziert. Dabei zeigte sich, dass es nach Dectin-1 siRNA Behandlung (97% +/- 1%) und der Co-Kultivierung mit Pilz zu einer wesentlich reduzierten *TNF-α* (50% +/- 15%; $p=0.02$) und *IL-12* (44% +/- 9%; $p<0.01$) Expression kam. Somit konnte Dectin-1 als wichtiger Immunrezeptor für *A. fumigatus* KS erkannt werden, über den die Aktivierung von DCs erfolgt.

Um weiterhin zu klären, ob es sich dabei um einen speziellen Rezeptor für *A. fumigatus* KS handelt, oder aber um einen allgemeinen Rezeptor für Pilze, wurde mit *C. albicans* KS (ATCC MYA-2876) nach Dectin-1 siRNA Transfektion stimuliert. Wenn Dectin-1 ausgeschaltet war, konnte gleichzeitig eine reduzierte Expression von *TNF- α* (70% +/- 18%; $p=0.05$) und *IL-12* (65% +/- 24%; $p<0.01$) nachgewiesen werden im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

4.7.10 Untersuchung der durch *A. fumigatus*, *C. albicans* und Zymosan vermittelten Immunantwort nach Dectin-1 Blockierung

Nachdem durch den Einsatz von siRNA Dectin-1 als Rezeptor für Pilze identifiziert wurde (s. 4.7.9), sollte in einem unabhängigen experimentellen Ansatz diese Hypothese bestätigt werden. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers sollte versucht werden, eine mögliche Signaltransduktion zu unterbinden. In diesem Experiment wurden DCs mit einem Antikörper gegen Dectin-1 (s. 3.2.11) für 30 min vorbehandelt und anschließend für 6 h mit Zymosan, LPS, *A. fumigatus* oder *C. albicans* stimuliert. Die Sekretion von *TNF- α* und *IL-12* ins Medium wurde mittels ELISA bestimmt (s. 3.8.1).



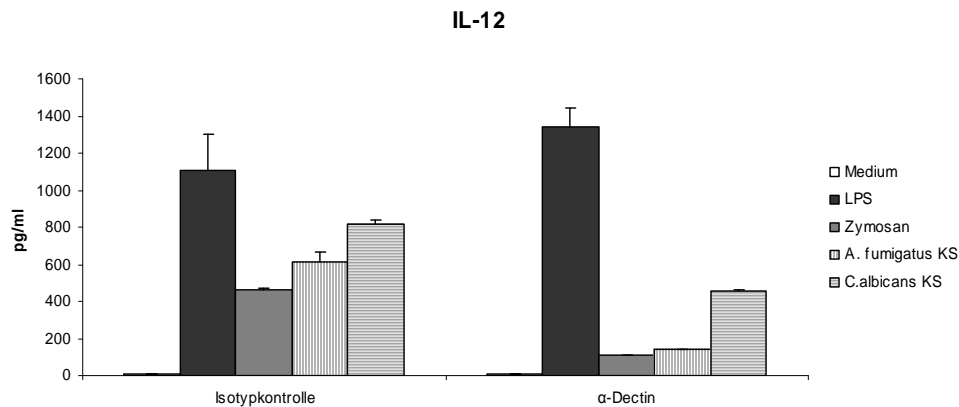


Abbildung 49: ELISA für TNF- α und IL-12p40 nach Stimulierung von DCs mit 1 μ g LPS, 10 μ g Zymosan, 1 Mio *A. fumigatus* Konidien, *A. fumigatus* KS und *C. albicans* KS. Vor der sechsständigen Stimulierung wurden 1×10^6 Zellen entweder mit der Isotypkontrolle IgG_{2B} oder mit 1 μ g/ml α -Dectin-1 Antikörper für 30 min vorinkubiert. Beim ELISA wurde eine Doppelbestimmung gemacht und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Insgesamt wurde das Experiment mit drei unterschiedlichen DC-Kulturen wiederholt.

LPS, Zymosan, *A. fumigatus* KS und *C. albicans* KS bewirkten eine starke Freisetzung von TNF- α und IL-12. Wenn die Zellen mit dem α -Dectin-1 Antikörper vorbehandelt wurden, hatte dies im Falle der Stimulation mit Zymosan (IL-12: 63% \pm 12%; TNF- α : 45% \pm 18%), *A. fumigatus* KS (IL-12: 80% \pm 3%; TNF- α : 31% \pm 12%) und *C. albicans* KS (IL-12: 61% \pm 20%; TNF- α : 88% \pm 12%) eine erheblich verringerte Cytokinfreisetzung zur Folge, die für LPS nicht zu sehen war (s. Abbildung 49).

Daraus wurde geschlussfolgert, dass Dectin-1 der Rezeptor für Pilze auf DCs ist, über den die Expression von pro-inflammatorischen Cytokinen induziert wird.

4.7.11 Untersuchung der durch *A. fumigatus* vermittelten Immunantwort nach Card-9 siRNA Transfektion

Um weitere Hinweise darüber zu bekommen, ob es sich bei Dectin-1 tatsächlich um den gesuchten Rezeptor für Pilze handelte, wurden zwei siRNAs gegen Card-9 eingesetzt. Wie neuere Untersuchungen gezeigt haben, handelte es sich bei Card-9 um ein Adapterprotein vom Dectin-1 Rezeptor, über welches die Aktivierung von NF κ B und die Expression von TNF- α vermittelt wird (Gross *et al.*, 2006).

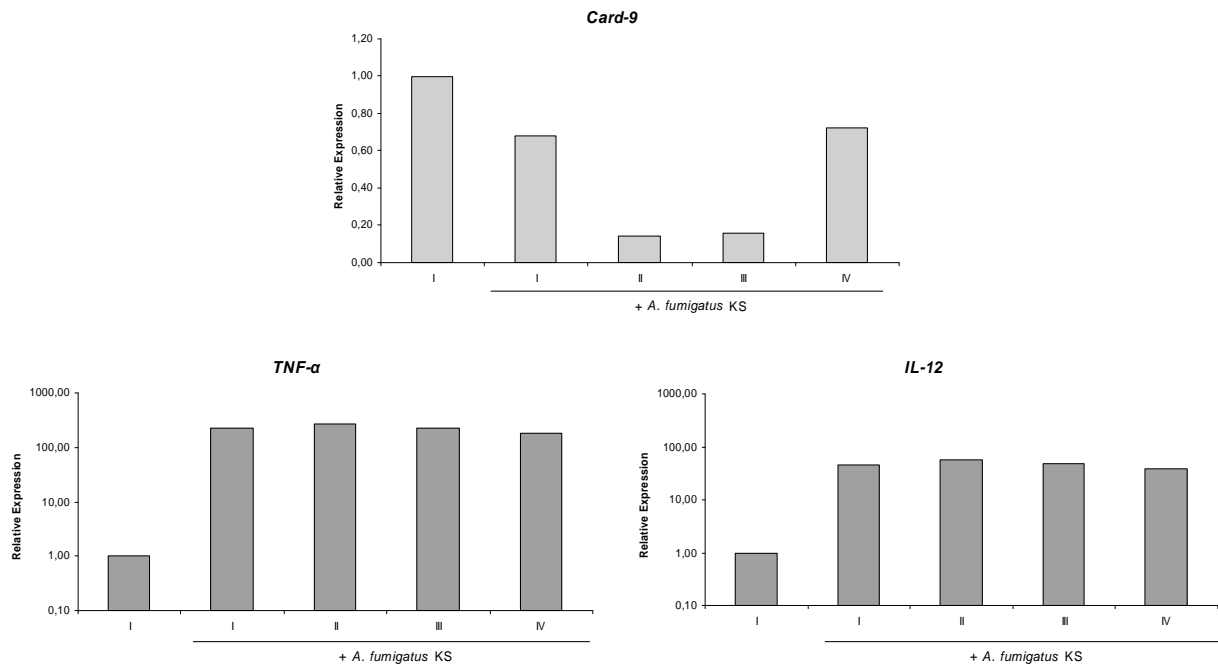


Abbildung 50: Relative Expression von *Card-9*, *IL-12* und *TNF-α*. DCs wurden entweder ohne siRNA (I), mit jeweils 133 nM *Card-9* (II), TLR2 siRNA (III) oder mit der non-silencing Kontrolle (IV) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 1×10^6 *A. fumigatus* KS für 6 h stimuliert.

Im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen bewirkten die siRNAs eine Runterregulation der Expression von *Card-9* um 81% [75-85%] (I) bzw. 81% [71-87%]. Erwartungsgemäß wurden durch Stimulation mit *A. fumigatus* KS *TNF-α* und *IL-12* deutlich stärker exprimiert. Die mit *Card-9* siRNA transfizierten Zellen zeigten dabei dieselbe Expression der beiden pro-inflammatorischen Cytokine wie die der *non-silencing* Kontrolle, so dass keine Pilz-induzierte Signaltransduktion über *Card-9* nachgewiesen werden konnte.

4.8 Interaktion von Granulozyten mit *A. fumigatus*

4.8.1 Microarray-Analysen nach Infektion von PMNs mit *A. fumigatus* KS (unter immunsuppressiver Wirkung von MPA)

Neutrophile Granulozyten (PMNs) sind zahlenmäßig die am häufigsten vorkommenden Leukozyten im Blut. Sie sind wichtige Funktionsträger im unspezifischen Abwehrsystem und spielen eine bedeutende Rolle bei der Beseitigung von Pilzinfektionen.

Um zu ermitteln, welchen Einfluss *A. fumigatus* KS auf die Genexpression von PMNs haben, wurden wie beim experimentellen Ansatz mit DCs (s. 4.6.2) Microarray-Analysen durchgeführt. Je 5×10^6 PMNs wurden entweder ohne MPA, mit MPA (50 μg / 5 ml), mit *A. fumigatus* KS (5 $\times 10^6$ / 5 ml) oder beides in Kombination für 6 h stimuliert. Anschließend wurde die Total-RNA isoliert (s. 3.6.1) und mittels Affymetrix-Chips das jeweilige Expressionsprofil bestimmt (s. 3.6.11).

Im Durchschnitt wurden 70 ng/ μl an RNA aus 5×10^6 Zellen isoliert (Gesamtvolumen: 35 μl). Da für die Markierungsreaktion 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ benötigt wurde, erfolgte vor der Biotin-Markierungsreaktion und Chip-Hybridisierung eine RNA-Amplifikation mit dem *Two Cycle Labelling Kit* (Affymetrix).

Von den 47.400 Transkripten des *Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays* waren im Durchschnitt ca. 7.500 Gene exprimiert (~20%). Tabelle 33 gibt einen Überblick über die Anzahl an differentiell exprimierten Genen beim Vergleich der verschiedenen experimentellen Ansätze.

Vergleich		4 fache Expression	2 fache Expression
unstimuliert	MPA	0	7
unstimuliert	<i>A. fumigatus</i>	195	1273
unstimuliert	MPA + <i>A. fumigatus</i>	246	1527

Tabelle 33: Anzahl an differentiell exprimierten Genen nach Stimulation von PMNs mit MPA bzw. *A. fumigatus* KS.

Die Behandlung der Granulozyten mit MPA führte zu keiner starken Veränderung des Expressionsprofils. Lediglich 7 Gene zeigten eine 2 fache Veränderung.

Beim Vergleich zwischen unbehandelten und mit *A. fumigatus* KS stimulierten Zellen wurden 195 Gene gefunden, die eine 4 fache Veränderung ihrer Expression aufwiesen. Dabei fiel auf, dass der Großteil der Gene (144) verringert exprimiert waren und ledig-

lich 54 Gene eine Hochregulation zeigten. Die interessantesten Gene ließen sich in folgende Gruppen einteilen:

	Gen-Name	Symbol	Expression	
Stress-Antwort / Extravasation	<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene</i>	<i>MAFF</i>	70	↑
	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	<i>VEGF</i>	23	
Cytokine	<i>Chemokin (C-C motif) Ligand 3</i>	<i>CCL3</i>	10	
	<i>Chemokin (C-X-C motif) Ligand 2</i>	<i>CXCL2</i>	7	
	<i>Interleukin 8</i>	<i>IL8</i>	4	
	<i>Interleukin 1 Rezeptor Antagonist</i>	<i>IL1RN</i>	4	
Oxidativer Stress	<i>Hämoxygenase</i>	<i>HMOX1</i>	22	
	<i>Heat shock 70kDa protein 8</i>	<i>HSPA8</i>	8	
	<i>Thioredoxin</i>	<i>TXN</i>	7	
	<i>Heat shock 70kDa protein 1B</i>	<i>HSPA1B</i>	7	
	<i>Heat shock 90kDa protein alpha</i>	<i>HSP90AB1</i>	7	
	<i>Ferritin</i>	<i>FTH1</i>	5	
	<i>Heat shock 70kDa protein 1A</i>	<i>HSPA1A</i>	5	
Immunrezeptoren	<i>Chemokin (C-X-C motif) Rezeptor 4</i>	<i>CXCR4</i>	5	
	<i>Toll-like Rezeptor 8</i>	<i>TLR8</i>	5	
	<i>CD14</i>	<i>CD14</i>	6	
	<i>Interleukin 8 Rezeptor, beta</i>	<i>IL8RB</i>	14	

Tabelle 34: Auswahl an interessanten, differentiell exprimierten Genen, die nach sechsständiger Co-Kultivierung von PMNs mit *A. fumigatus* KS hoch- bzw. runterreguliert waren.

Die Klassifikation der differentiell exprimierten Gene machte deutlich, dass *A. fumigatus* KS das Expressionsprofil der PMNs weniger stark beeinflusste, als dies bei den Versuchen mit den DCs beobachtet worden war (s. 4.6.2).

Das Gen, das die höchste Expression zeigte, war *MAFF*, von dem bekannt ist, dass es als Transkriptionsfaktor eine Stress-Antwort vermittelt. Wichtig in diesem Zusammenhang waren auch die auffallend große Zahl an Hitzeschock-Genen und solchen Genen, die vor den selbst gebildeten Sauerstoffradikalen schützen (s. auch Abschnitt 4.8.2). Was das Spektrum an Cytokinen betraf, so wurden lediglich *CCL3*, *CXCL2*, *IL-8* und *IL-1RN* nach Pilzkontakt stärker exprimiert, wohingegen die bekannten proinflammatorischen Cytokine *CCL20*, *TNF- α* und *IL-12* keine Veränderung gezeigt hatten.

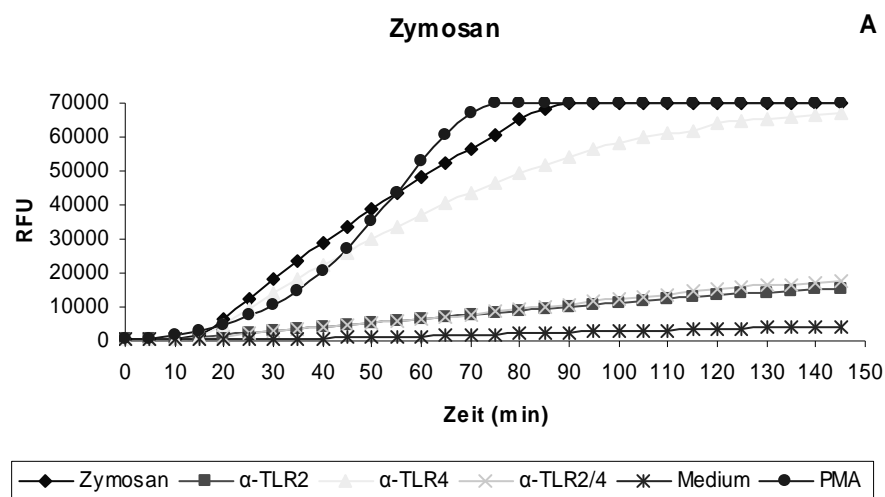
Die in diesem Abschnitt präsentierten Daten und die bei den DC-Experimenten gefundenen differentiell regulierten Gene (s. 4.6.2) bildeten die Grundlage für die Herstellung

eines selbst gespotteten Microarray-Chips, der momentan zusammen mit dem Fraunhofer-Institut in Stuttgart entwickelt wird.

4.8.2 Rolle von TLR2, TLR4 und Dectin-1 bei der Induktion des *Oxidativen Burst*

Neben der Fähigkeit zur Phagozytose sind Granulozyten in der Lage, Pathogene mit Sauerstoffradikalen zu bekämpfen (*Oxidativer Burst*). Dass dabei insbesondere TLR2 und TLR4 den Aktivitätszustand der Granulozyten regulieren, konnte unlängst gezeigt werden (Bellocchio *et al.*, 2004). Deshalb lag der Verdacht nahe, dass auch die Bildung von Sauerstoffradikalen durch die Aktivierung von TLR2, TLR4 oder Dectin-1 moduliert wird.

Gemäß Abschnitt 3.5.5 wurden PMNs isoliert und für 30 min mit Antikörpern gegen TLR2, TLR4 und Dectin-1 (s. 3.2.11) in einer Konzentration von 1 µg/ml vorbehandelt. Anschließend wurden die Granulozyten auf eine 96-Well-Platte verteilt, mit Zymosan, LPS oder *A. fumigatus* KS stimuliert und die Sauerstoffradikalbildung gemessen (s. 3.5.6).



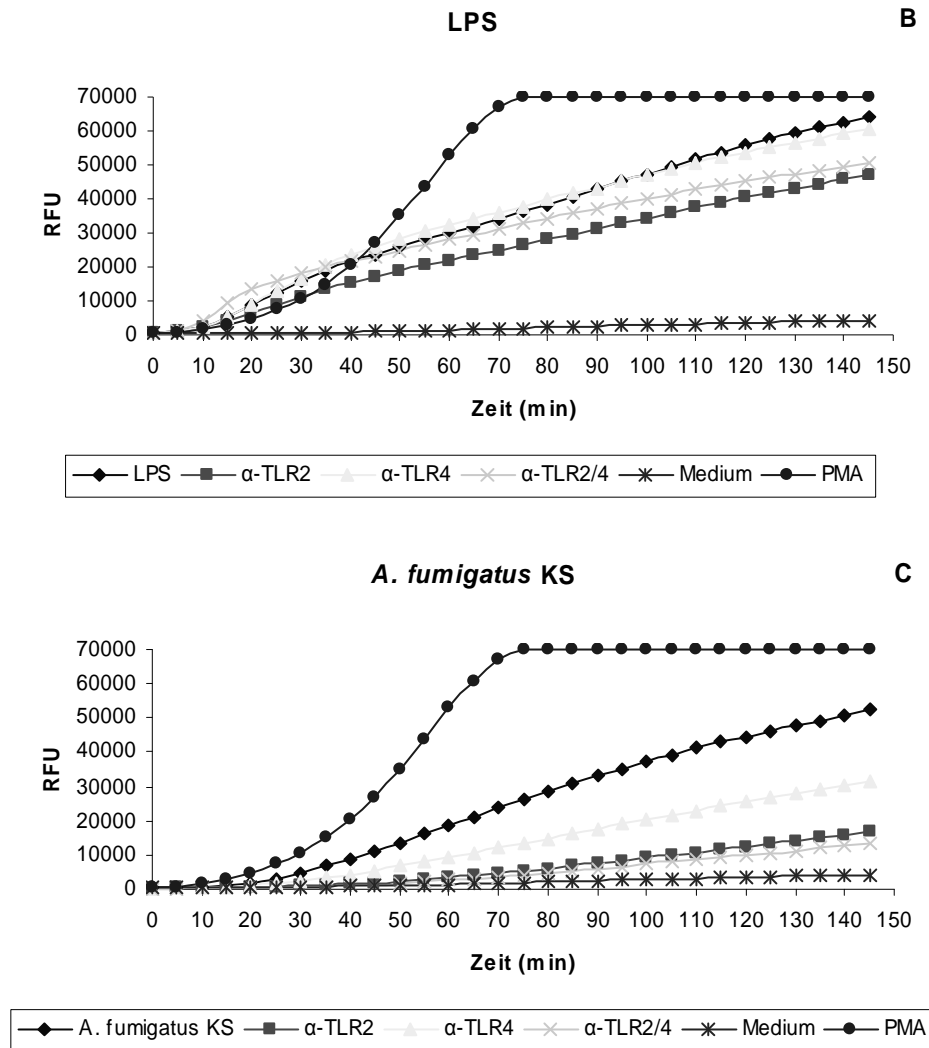


Abbildung 51: Beteiligung von TLR2, TLR4 und Dectin-1 an der Induktion des *Oxidativen Bursts*. 2×10^5 Granulozyten wurden vor ihrer Stimulation mit $100 \mu\text{g}$ Zymosan, $500 \mu\text{g}$ LPS oder 2×10^6 *A. fumigatus* KS mit dem TLR2, TLR4 Antikörper oder der Isotypkontrolle IgG Rabbit in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde die Sauerstoffradikalbildung gemessen. Aufgetragen auf der x-Achse ist die Zeit in Minuten, wobei alle 5 min eine Messung der Fluoreszenzintensitäten (RFU: relative Fluoreszenzintensität) erfolgte. Das Ergebnis ist für drei verschiedene Blutspender repräsentativ.

Die Stimulation mit Zymosan führte zur Bildung von Sauerstoffradikalen, wobei der *Oxidative Burst* durch den TLR2, nicht aber durch den TLR4 Antikörper verringert wurde (A). LPS stellte sich als schlechter Stimulus für den *Oxidativen Burst* heraus, da nur mit Konzentrationen oberhalb von $500 \mu\text{g}$ positive Antworten zu bekommen waren (B).

Erwartungsgemäß führten *A. fumigatus* KS zur Induktion der Bildung von Sauerstoffradikalen (C). In den Ansätzen, in denen die Granulozyten mit einem der beiden TLR Antikörpern vorbehandelt wurden, kam es zu einer reduzierten Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die für TLR2 stärker ausfiel als für TLR4. Wurden beide Antikörper gemeinsam zu den Granulozyten gegeben, so wurden die Einzeleffekte nochmals verstärkt.

Keine Reduktion des *Oxidativen Bursts* wurde bei Verwendung des α -Dectin-1 Antikörpers beobachtet (Daten nicht gezeigt).

4.8.3 Einfluss von Immunsuppressiva auf den *Oxidativen Burst* von Granulozyten

Für eine effektive Beseitigung von Pilzinfektionen sind Granulozyten außerordentlich wichtig. Ob PMNs auch unter dem Einfluss von Immunsuppressiva (s. 3.2.6) in der Lage sind, Sauerstoffradikale zu bilden, sollte hier experimentell ermittelt werden. Granulozyten wurden gemäß dem Protokoll in Abschnitt 3.5.5 isoliert und 2×10^5 Zellen pro Well für den *Oxidativen Burst* eingesetzt (s. 3.5.6).

In einem Vorexperiment wurde untersucht, ob die Immunsuppressiva bereits alleine einen *Oxidativen Burst* auslösen. Die Immunsuppressiva wurden in verschiedenen Konzentrationen (10 ng, 100 ng, 1 μ g und 10 μ g) zu den Granulozyten gegeben und eine Kinetikmessung der Sauerstoffradikalbildung für 2,5h durchgeführt (s. Abbildung 52). Als Positivkontrolle wurde mit 50 ng/ml PMA stimuliert und als Negativkontrolle das jeweilige Lösungsmittel der Immunsuppressiva zugegeben.

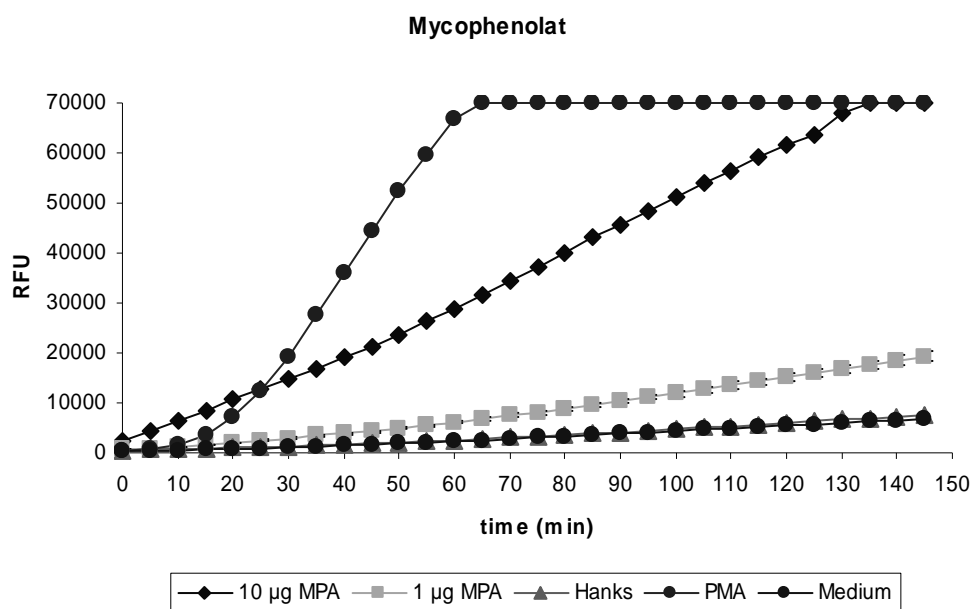
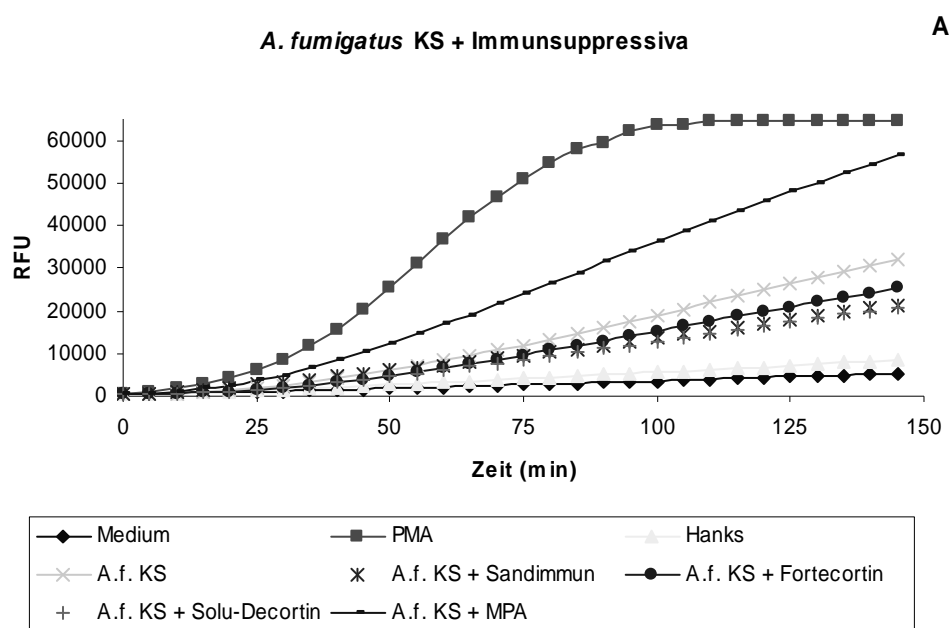


Abbildung 52: Stimulierung von Granulozyten mit 10 μ g bzw. 1 μ g MPA, Hanks (Lösungsmittel) oder PMA zur Induktion des *Oxidativen Bursts*. Es wurde für jeden Ansatz eine Vierfachbestimmung gemacht und daraus der Mittelwert berechnet. Die Standardabweichung ist der besseren Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet.

Bei diesen Untersuchungen fiel auf, dass CellCept (Daten nicht gezeigt) und MPA (s. Abbildung 52) bei einer Konzentration zwischen 1 µg und 10 µg PMNs zum *Oxidativen Burst* anregen. Alle Konzentrationen unter 1 µg hatten keinen Effekt sichtbaren Effekt. Im Gegensatz dazu konnten keine derartigen Beobachtungen für Sandimmun, Fortecortin, Solu-Decortin und RAD gemacht werden (Daten nicht gezeigt).

Um herauszufinden, ob die besagten Immunsuppressiva den durch PMA ausgelösten *Oxidativen Burst* negativ beeinflussen, wurden PMNs gleichzeitig mit PMA und Immunsuppressiva (1 µg) stimuliert. Bei gleichzeitiger Gabe wirkte keines der Immunsuppressiva inhibierend. Was MPA betraf, so wurde der durch PMA induzierte *Oxidative Burst* noch verstärkt (Daten nicht gezeigt).

Dass PMNs neben dem künstlichen Stimulus PMA auch zum *Oxidativen Burst* durch *A. fumigatus* angeregt werden, wurde im vorherigen Abschnitt gezeigt (s. 4.8.2). Hier sollte nun geschaut werden, ob die durch Pilzkontakt verursachte Stimulation durch Immunsuppressiva unterdrückt wird. Die Experimente wurden mit *A. fumigatus* Konidien und KS durchgeführt (s. Abbildung 53).



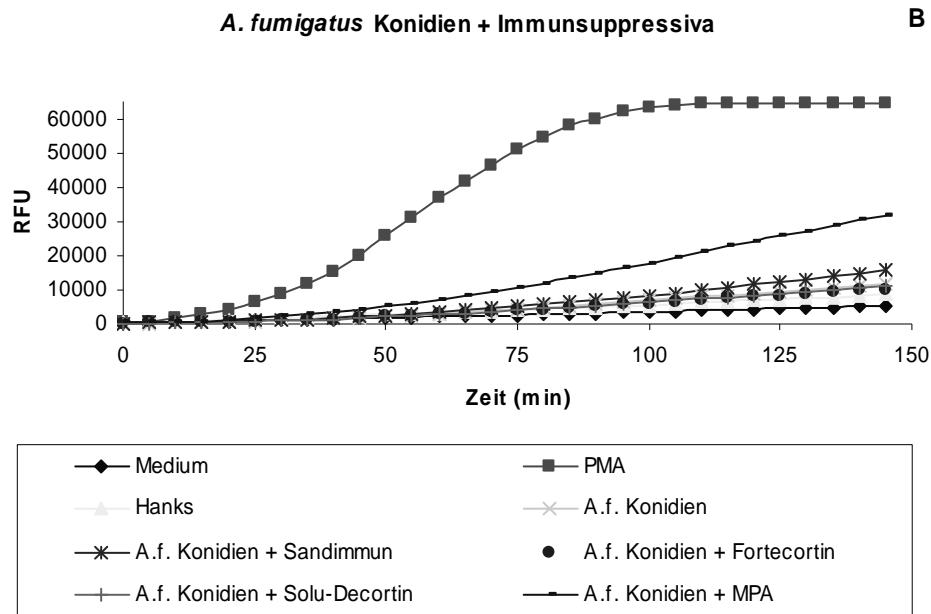


Abbildung 53: Stimulierung von Granulozyten mit *A. fumigatus* KS und gleichzeitiger Immunsuppressiva Gabe. Die Standardabweichung der gemessenen Sauerstoffradikalbildung ist der besseren Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet.

Sehr schön zu sehen war, dass *A. fumigatus* KS (A) einen stärkeren Stimulus für den *Oxidativen Burst* darstellten als *A. fumigatus* Konidien (B). KS stimulierten PMNs selbst bei einer um den Faktor 10 geringeren Konzentration genauso stark wie Konidien. Anhand dieser Untersuchungen wurde deutlich, dass die verschiedenartigen Pilzmorphologien die Granulozytenaktivität unterschiedlich beeinflussten.

Interessant war die Beobachtung, dass wieder CellCept (MPA) alle verwendeten Pilzstimulationen deutlich verstärkte. Dexamethason, Solu-Decortin und RAD hatten keinen Einfluss auf den *Oxidativen Burst*, wenn zu den PMNs *A. fumigatus* KS gegeben wurden (Daten nicht gezeigt).

4.9 Zusammenhang zwischen SNPs im *CXCL10* Gen und einem erhöhten Risiko für eine IA nach Stammzelltransplantation

In einer ähnlichen Analyse wie bei der Suche nach SNPs, die mit einer HCMV Reaktivierung / Erkrankung in Verbindung standen (s. 4.5), wurde untersucht, ob ausgesuchte SNPs das Risiko für eine invasive Aspergillose (IA) nach allogener Stammzelltransplantation beeinflussen. Die DNA-Bank umfasste DNA-Proben von 58 Patienten, bei denen

keine IA diagnostiziert wurde, und 81 Patienten mit einer IA. Zur Durchführung der Genotypisierungen von 84 SNPs in 18 immunrelevanten Genen wurden die DNA-Proben zum Max-Delbrück-Zentrum in Berlin (Dr. Mohammad Toliat) geschickt. Die statistische Analyse wurde vom Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Dr. Michael Steffens) übernommen.

Insgesamt konnten ein Marker in *IFN-γ* (rs2069705) und drei Marker (rs1554013, rs3921, rs4257674) im Promotor-Bereich von *CXCL10* gefunden werden, die signifikant assoziiert waren mit dem verstärkten Auftreten einer IA (s. Tabelle 35).

Gen	dbSNP Nummer	Allel	Kontrolle	IA	p-Wert
CXCL10 (4q21)	rs1554013 (+11101 C/T)	C/C	9	24	0.007
		C/T	29	20	
		T/T	11	7	
	rs3921 (+1642 C/G)	C/C	9	3	0.003
		C/G	27	15	
		G/G	10	21	
	rs4859588 (+908 A/G)	A/A	8	19	0.057
		A/G	28	20	
		G/G	10	8	
	rs4257674 (-1101 A/G)	A/A	12	5	0.001
		A/G	22	19	
		G/G	10	28	
IFN-γ (12q14)	rs2069705 (-1616 C/T)	C/C	27	22	0.010
		C/T	24	30	
		T/T	5	17	

Tabelle 35: Statistische Auswertung (Allel-Frequenz-Differenz-Test) zur SNP-Analyse im Zusammenhang mit dem erhöhten Risiko für eine IA nach allogener Stammzelltransplantation.

In wie weit die Expression von *CXCL10* durch *A. fumigatus* beeinflusst wird, sollte im Folgenden untersucht werden. 1×10^6 PMNs (s. 3.5.5), Monozyten (s. 3.5.3) oder DCs (s. 3.5.4) wurden für 6 h mit KS inkubiert und anschließend die Expression von *CXCL10* am Light Cycler ermittelt (s. 3.6.4) und gegen *h-Actin* normalisiert (s. 3.6.5).

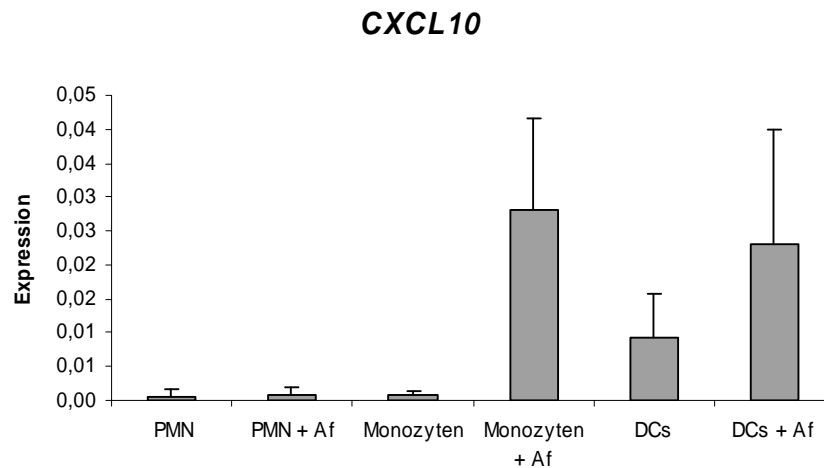


Abbildung 54: Expressionsanalyse von *CXCL10* am *Light Cycler*. PMNs, Monozyten oder DCs wurden für 6 h mit *A. fumigatus* KS stimuliert. Das Ergebnis ist repräsentativ für insgesamt drei Wiederholungen mit drei unterschiedlichen Spendern.

Im Gegensatz zu Granulozyten zeigten Monozyten und DCs eine durch *A. fumigatus* KS induzierbare *CXCL10* Expression.

Wie im vorherigen Abschnitt sollten funktionelle Analysen klären, ob die Stärke der Pilz-induzierten Expression von *CXCL10* von einem der identifizierten Risikoallele abhängig ist. Von insgesamt 14 gesunden Spendern wurde genomische DNA isoliert und mittels Sequenzierung genotypisiert (s. 3.6.9).

Nach Auswahl von jeweils drei Spendern, die homozygot für rs1554013 (CC und TT), rs3921 (CC und GG) und rs4257674 (GG und AA) waren, wurde diesen Personen 150 ml Blut abgenommen und daraus DCs generiert (s. 3.5.4). Nach 6d wurden von jedem Spender 1 Mio DCs mit 1 Mio *A. fumigatus* KS für 6 h co-kultiviert und die *CXCL10* Expression ermittelt (s. Abbildung 55).

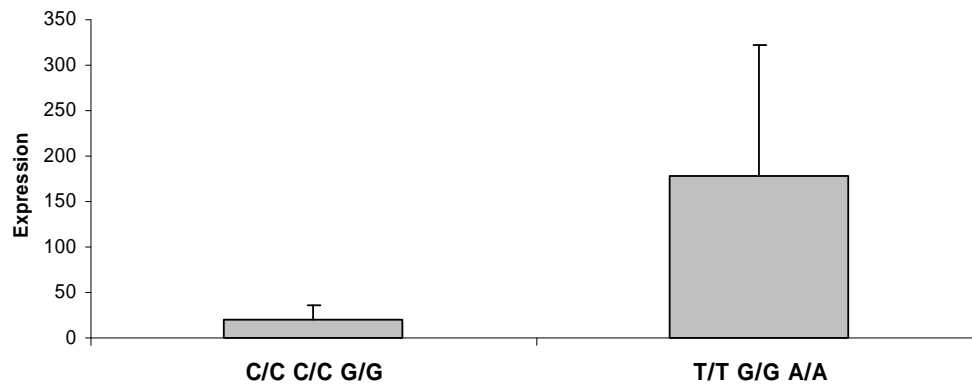
CXCL10 Induktion durch *A. fumigatus*

Abbildung 55: Expression von *CXCL10* nach Stimulation von DCs mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund mit *A. fumigatus* KS für 6 h. Es wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der Expression von *h-Alas* und *CXCL10* jeweils drei Spendern berechnet.

Die Stimulation mit *A. fumigatus* KS führte zu einer tendenziell höheren Expression (9,3 fach) von *CXCL10*, wenn DCs von Spendern generiert wurden, die den Haplotyp TT GG AA (53,4 - 335,5 fach) aufwiesen im Vergleich zum Risikohaplotyp CC CC GG (1,5 - 35,8 fach).

5 Diskussion

5.1 Generierung und Infektion von DCs mit HCMV

Bei der Etablierung der Methode zur Generierung von DCs aus Monozyten zeigte sich deutlich, dass die Auswahl der Blutprodukte von entscheidender Bedeutung war. Trotz mehrfacher Versuche war es nicht möglich, aus *Buffy Coats*, die vom BRK Würzburg bezogen wurden, DCs zu generieren (s. 4.1.2). Die Population, die erzeugt wurde, konnte anhand der Oberflächenmarker CD1a, CD14, CD40, CD80, CD83 und CD86 nicht eindeutig definiert werden. Ein plausibler Grund hierfür könnte die etwas andere Methode zur Herstellung der *Buffy Coats* sein, bei der die gewünschten Zellen über einen Filter (im Gegensatz zur Zentrifugation) isoliert und die restlichen Zellen als *Buffy Coats* verkauft werden. Der Verdacht liegt nahe, dass der Kontakt zwischen Filter und Leukozyten, diese in irgendeiner Form aktiviert und dadurch eine vollständige Differenzierung zu DCs verhindert.

Die Infektion von DCs mit dem HCMV Stamm TB40E gestaltete sich äußerst arbeits- und zeitaufwendig. Die Ursachen dafür waren vielfältig und umfassten die Bewältigung von zahlreichen technischen Schwierigkeiten bei der Anzucht von HCMV in einem stabilen Fibroblastenzellkultursystem, die Virustiterkontrolle, die Etablierung von Methoden zum Infektionsnachweis und der Optimierung der Infektionseffizienz bei DCs (s. 3.3).

Es zeigte sich deutlich, dass ein Aufschluss der Wirtszellen durch mehrfaches Einfrieren und Wiederauftauen, die Ausbeute an Virus mehr als verdoppelte, als wenn eine Aufreinigung lediglich aus dem Überstand erfolgte (s. 4.1.3). Des Weiteren wurde bei der Anzucht von verschiedenen HCMV Stämmen (HB5 und TB40E) deutlich, dass diese unterschiedlich gut in Fibroblasten replizierten, und somit unterschiedliche Virusmengen zu erwarten waren. Dies war darauf zurückzuführen, dass TB40E ein in Endothelzellen propagierter Stamm war und somit eine schlechtere Replikationsfähigkeit in Fibroblasten besaß als HB5.

5.2 Etablierung einer Methode zur siRNA Transfektion von DCs

Nachdem DCs erfolgreich generiert wurden (s. 4.1.2), gelang es diese effizient mit siRNA zu transfizieren (s. 4.3). In Übereinstimmung zur Arbeit von Prechtel *et al.*, 2006 erwies sich die Elektroporation als eine leistungsfähige Methode zur siRNA Transfektion, um DC Manipulationen an einer großen Zahl an Zellen vorzunehmen. Die Auswertung der FACS Analyse ergab im Vergleich zur Immunfluoreszenzfärbung eine Transfektionsrate von 90% versus 80%. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass bei einem Stromimpuls von 340 V für 10 ms durchschnittlich 85% der DCs mit siRNA transfiziert wurden.

In dieser Arbeit konnte ein siRNA vermitteltes *gene-silencing* für *TLR2* (s. 4.3.2), *TLR3* (s. 4.4), *TLR4* (s. 4.7.3), *MyD88* (s. 4.7.5), *DC-SIGN*, *PTX-3* (s. 4.7.7), *Dectin-1* (s. 4.7.8) und *Card-9* (s. 4.7.11) für DCs aufgezeigt werden, ohne dass dies einen sonstigen (beobachtbaren) negativen Einfluss auf die Zellen hatte. Dies zeigte sich vor allem daran, dass die Zellen den Vorgang der Elektroporation überlebten, was durch eine einfache Trypanblau-Färbung nach Transfektion nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Ferner waren die Zellen nach Elektroporation nicht in ihrer Fähigkeit eingeschränkt, auf die verwendeten Stimuli (TLR Liganden, *A. fumigatus* KS, HCMV) zu reagieren.

Seit einiger Zeit gab es Berichte, wonach der Einsatz von dsRNA Interferonantworten auszulösen schien. So zeigten Kariko *et al.* im Jahr 2004, dass der Einsatz von siRNA bei humanen Makrophagen einen Expressionsanstieg von *IFN- α* und *TNF- α* hervorrief. In eigenen Untersuchungen wurde ein solcher Expressionsanstieg nicht festgestellt (s. 4.3.3). Vermutlich scheint dies darauf zurückzuführen zu sein, dass Kariko *et al.* die Lipofektion (im Gegensatz zur Elektroporation) als Transfektionsmethode wählten. Des Weiteren wurde unlängst gezeigt, dass auch die Sequenz der verwendeten siRNA von Bedeutung zu sein scheint (Sioud, 2005).

Am Beispiel von *TLR2* und *TLR3* konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass ein in DCs induzierter RNAi-Effekt über mehrere Tage anhielt (s. 4.3.2). Dass während dieser Zeit die reduzierte Expression kaum nachließ, scheint darauf zurückzuführen sein, dass sich DCs in Kultur nicht weiter teilten und somit eine Ausdünnung an siRNA unterbleibt. Die Wirksamkeit der RNAi und die damit verbundenen Expressionsveränderungen von immunrelevanten Genen konnten eindrucksvoll für *TLR3* und

poly I:C, für TLR4 und LPS, sowie für Dectin-1 und Zymosan am *Light Cycler* nachgewiesen werden (s. 4.4.1, 4.7.3, 4.7.8).

5.3 Rolle von TLR2, TLR3, TLR9 und DC-SIGN bei der Induktion einer Immunantwort von DCs nach HCMV Infektion

In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Microarray-Experimente zeigten, dass die Immunantwort von DCs nach Infektion mit verschiedenen HCMV Stämmen (TB40E und AD169) unterschiedlich ausfiel (Daten unveröffentlicht). Obgleich beide HCMV Stämme DCs infizieren können, unterscheiden sie sich doch dahingehend, dass nur TB40E den vollen Replikationszyklus durchlaufen und neue Virionen bilden kann (Jahn *et al.*, 1999). AD169 hat diese Fähigkeit aufgrund der mehrfachen Passagierung in Fibroblasten und der damit verbundenen Anreicherung von Mutationen im viralen Genom verloren (Sinzger *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu AD169 führte die Infektion mit TB40E zu einer verstärkten Expression von Klasse I Interferonen, pro-inflammatorischen Cytokinen und *TLR3* (s. 4.1.4; Gebhard, 2004). Unlängst wurde für *TLR3* gezeigt, dass es einen funktionellen Zusammenhang mit der Expression von *IFN- β* und weiteren pro-inflammatorischen Cytokinen gibt (Compton *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003). Bei den Untersuchungen des *TLR* Expressionsprofils verschiedener Leukozyten-Populationen zeigte sich deutlich, dass DCs, im Gegensatz zu anderen Immuneffektorzellen, eine hohe Expression für *TLR3* aufwiesen (s. 4.2). Mittels intrazellulärer FACS-Analyse konnte bestätigt werden, dass *TLR3* intrazellulär lokalisiert war (s. 4.2.2). Folglich lag der Verdacht nahe, dass eine Infektion von DCs durch HCMV (TB40E) eine Immunantwort induziert, die durch *TLR3* vermittelt wird.

Der zunächst auftretende Widerspruch, dass *TLR3* ein Rezeptor für dsRNA ist (Alexopoulou *et al.*, 2001) und HCMV als Genom dsDNA besitzt, kann durch folgende Beobachtung erklärt werden. Aufgrund der überlappenden Leserahmen und der bidirektionalen Transkription von viralen Genen kann es zur Hybridisierung einzelner RNA-Moleküle kommen (Jacobs und Lengland, 1996). Eine mögliche Hypothese besagt, dass es dadurch zur Bildung von dsRNA-Intermediaten kommt, die als Stimuli für den intrazellulär lokalisierten *TLR3* fungieren (Matsumoto *et al.*, 2003). Für

BMDCs aus der Maus konnte TLR3 bereits als Rezeptor für MCMV bestätigt werden (Tabeta *et al.*, 2004).

In wie weit sich die Methode der RNAi zur Untersuchung einer möglichen Interaktion eignet, wurde durch den Einsatz einer spezifischen TLR3 siRNA und dem TLR3 Liganden poly I:C untersucht (s. 4.4). Erwartungsgemäß kam es durch die Stimulierung mit poly I:C zu einer erhöhten Expression von Klasse I Interferonen und proinflammatorischen Cytokinen. Die Erhöhung der Expression von *IFN-β* fiel für die Ansätze mit TLR3 siRNA geringer aus, wobei mit LPS stimulierte Zellen diesen Effekt nicht zeigten. Für *IFN-α* wurde keine reduzierte Expression nach TLR3 siRNA Transfektion beobachtet. Dies stand im Gegensatz zu den Experimenten von Alexopoulou *et al.* (2001), wo eine, obgleich auch sehr schwache, Reduktion beschrieben wurde.

Aufgrund der Experimente mit TLR3 siRNA und poly I.C-Stimulation war es möglich, einem möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen TLR3 und HCMV weiter nachzugehen. Hierbei zeigte sich, dass die Infektion von DCs mit dem Stamm TB40E zu einer Induktion von *IFN-α*, *IFN-β*, *CXCL10* und *CXCL11* führte. Ob die Expression dieser Cytokine tatsächlich über TLR3 vermittelt wird, bleibt allerdings zum jetzigen Zeitpunkt spekulativ, da mit den siRNAs gegen TLR3 unter diesen experimentellen Bedingungen keine Interaktion nachzuweisen war (s. 4.4.3). Vielmehr deutete die frühe Induktion von *IFN-β* darauf hin (s. 4.1.4), dass die Expression von Klasse I Interferonen über membranständige Rezeptoren angeschaltet wird, noch bevor die Virusreplikation (und somit eine mögliche Aktivierung über TLR3 durch dsRNA Intermediate) begonnen hat. Des Weiteren ist aufgrund der zeitverzögerten Expression von *CXCL10* und *CXCL11* davon auszugehen, dass diese durch freigesetztes *IFN-β* autokrin induziert wird, wie es bereits von Severa *et al.*, 2006 vorgeschlagen wurde.

Weshalb keine verringerte Expression von *IFN-β* nach Ausschalten von *TLR2* und *DC-SIGN* zu beobachten war (s. 4.4.5), ist nicht mit vollständiger Sicherheit zu beantworten und könnte auf andere Immunrezeptoren zur Erkennung von HCMV hindeuten, wie z.B. PTX-3 (Bozza *et al.*, 2006), was in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde. Ein Aspekt, der ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden sollte, ist die Art und Weise, wie das Viruskonzentrat hergestellt wurde (s. 3.3.3). Neben den eigentlichen infektiösen Partikeln sind auch immer eine große Anzahl an unvollständigen Viren enthalten (Prof. Mach, Institut für Virologie in Erlangen, persönliche Mitteilung), die zusätzlich stimulierend wirken und gerade schwache Expressionsunterschiede zwischen untransfizierten und mit siRNA transfizierten Zellen überdecken

können. Um dies auszuschließen wäre es ratsam, das Viruskonzentrat über einen Dichtegradienten weiter aufzureinigen, wofür inzwischen ein entsprechendes Protokoll im Labor vorliegt.

Auch für TLR9 konnte keine Funktion bei der Induktion einer Immunantwort bei DCs festgestellt werden. Am *Light Cycler* durchgeführte Untersuchungen zeigten eine *TLR9* Expression am Rande der Detektierbarkeit (s. 4.4.4). Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu bisherigen Angaben in der Literatur: Iwasaki und Medzhitov, 2004 geben in ihrem Übersichtsartikel an, dass *in vitro* generierte DCs, im Gegensatz zu plasmazytoiden DCs, keine Expression für TLR9 aufweisen. Dabei berufen sie sich auf Expressionsanalysen, die mittels konventioneller PCR mit 40 PCR-Zyklen und Agarosegelelektrophorese durchgeführt wurden (Kadowaki *et al.*, 2001). Wegen der kleineren Zyklenzahl und der geringeren Sensitivität im Vergleich zur hier durchgeführten qRT-PCR könnte dies der Grund für eine unterschwellige Expression sein, die durch wenige, eventuell vorhandene plasmazytoide DCs hervorgerufen wurde. Bereits das Vorhandensein von nur wenigen anderen Zelltypen, die TLR9 exprimieren, kann dazu führen, dass mit dem *Light Cycler* positive Signale erhalten werden. Das ist auch der Grund dafür, warum die qRT-PCR gerne in der Diagnostik für Pilz- und Virusinfektionen eingesetzt wird. Das Nicht-Vorhandensein von TLR9 scheint sich auch durch die fehlenden siRNA-Effekte und die nicht-signifikante Stimulierbarkeit mit CpG DNA zu bestätigen (s. 4.4.4).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Unterschied zur Maus, wo MCMV von Makrophagen über TLR3 und TLR9 erkannt wird (Tabeta *et al.*, 2004), eine Beteiligung von TLR9 bei der Erkennung von HCMV durch humane *ex vivo* generierte DCs auszuschließen ist, und für TLR2, TLR3 und DC-SIGN bislang nicht nachgewiesen werden konnte.

5.4 Immunantwort von DCs und Granulozyten nach Kontakt mit *A. fumigatus* KS

DCs gelten als Wachen des Immunsystems, die an der Auslösung von angeborenen und adaptiven Immunantworten beteiligt sind. Nach Kontakt mit Krankheitserregern machen unreife DCs eine Differenzierung durch, im Zuge dessen es zu einer erhöhten Expression von Co-stimulatorischen Molekülen und einer verbesserten Antigenpräsentation kommt (s. 2.6). All dies geschieht, um naive T Zellen wirkungsvoll zu aktivieren (Burns und Thrasher, 2004). Sowohl in den Microarray-Analysen (s. 4.6.2),

tivieren (Burns und Thrasher, 2004). Sowohl in den Microarray-Analysen (s. 4.6.2), als auch im Durchflusszytometer (s. 4.6.3) konnte eine Reifung (gekennzeichnet durch eine Hochregulation von CD40, CD80, CD83 und CD86) nach Co-Inkubation mit *A. fumigatus* KS nachgewiesen werden (s.a. Braedel *et al.*, 2006).

Mit Hilfe der *Gene Ontology Tree Machine* (GOTM) zur Klassifikation von Array-Daten (Zhang *et al.*, 2004; <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>) wurden Gene, die eine differentielle Regulation zeigten, in die Bereiche Signaltransduktion, Zell-/Zell-Kommunikation, Differenzierung von myeloiden Zellen, Apoptose, Immun- und Verteidigungsantworten eingruppiert. Anhand dieser Aufzählung wird deutlich, dass der Kontakt mit *A. fumigatus* KS drastische Auswirkungen auf das Expressionsprofil von DCs hatte.

Im Zuge der Infektion wurden verschiedene Verteidigungsstrategien angeschaltet, die eine Aktivierung von Phagozytosemechanismen und eine Mobilisierung anderer Immuneffektorzellen durch Freisetzung von chemotaktischen Cytokinen beinhaltete (Romani, 2004; Gafa *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde ein Cytokinexpressionsprofil ermittelt, welches früheren Arbeiten ähnlich war, in der die Immunantwort von humanen Monozyten gegenüber *A. fumigatus* und *C. albicans* untersucht wurde (Kim *et al.*, 2005; Cortez *et al.*, 2006; Haddad 2006). In diesen Studien wurden ebenfalls *IL-1 β* , *IL-8*, *CXCL2*, *CCL3*, *CCL4* und *CCL20* gefunden, die nach Pilz-Kontakt verstärkt exprimiert waren. Unter allen differentiell regulierten Genen zeigte *CCL20* (*MIP-3 α*) die stärkste Hochregulation (950fach). *CCL20* ist der einzig bislang bekannte Ligand für den Chemokin-Rezeptor CCR6, der hauptsächlich auf B-Zellen und bestimmten T-Zellen exprimiert wird (Williams, 2006). Ähnliche Funktionen wie für *CCL20* wurden für *CCL5* (Rantes) beschrieben, welches Monozyten, T-Helferzellen und eosinophile Granulozyten zum Infektionsherd dirigiert (Appay und Rowland-Jones, 2001). Einen Überblick über das komplizierte Netzwerk von Cytokinen und Cytokin-Rezeptoren, die an der Verteidigung gegen *A. fumigatus* beteiligt sind, kann in Phadke und Mehrad, 2005 nachgelesen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass *CCL5*, *CCL20* und weitere Chemokine für eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems und für eine wirkungsvolle Beseitigung der Pilze zusammenwirken.

Im Gegensatz zu DCs wurden lediglich 54 Gene (darunter nur fünf Cytokine) gefunden, die in Granulozyten nach Infektion mit *A. fumigatus* vermehrt exprimiert waren (s. 4.8). Daraus läßt sich schließen, dass die Aufgabe der PMNs weniger darin besteht, andere Immuneffektorzellen zu aktivieren, als vielmehr invasive Pilze direkt zu

bekämpfen. Dies scheint nicht zuletzt mit Hilfe des *Oxidativen Bursts* zu erfolgen (s. 4.8.2), wobei sich die Zellen selbst vor den Sauerstoffradikalen zu schützen versuchen, indem verschiedene Hitzeschock-Gene und Radikalfängergene (*Thioredoxin*, *Hämoxygenase*, *Ferritin*) hochreguliert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PTX-3* durch *A. fumigatus* KS in DCs hochreguliert wurde (s. 4.6.4). Diese Entdeckungen befinden sich in Übereinstimmung mit neueren Berichten, die eine Rolle von *PTX-3* bei der Phagozytose von *A. fumigatus* Konidien und einer damit verbundenen Aktivierung des Komplementfaktors C1q beschreiben (Gaziano *et al.*, 2004). Mäuse, bei denen *PTX-3* mutiert wurde, waren für eine Lungeninfektion mit *A. fumigatus* deutlich empfänglicher (Garlanda *et al.*, 2002). Dies unterstreicht noch einmal die Bedeutung von *PTX-3* als Immunrezeptor bei der Erkennung und Abwehr von Pilzen.

5.5 *A. fumigatus* KS als potentielle Aktivatoren von TLR2 und TLR4

Durch den Kontakt zwischen DCs und *A. fumigatus* findet eine Aktivierung über TLR- und nicht-TLR-abhängige Signalwege statt (Hohl *et al.*, 2006). In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Arbeiten, in denen die Signaltransduktion verschiedenster Immuneffektorzellen über TLR2 und TLR4 untersucht wurde. Eine Übersicht über die Interaktion von TLRs mit Pilzen findet sich in Roeder *et al.*, 2004 und in Levitz, 2004. Bei genauerer Betrachtung der Literatur fallen einige Unterschiede in den jeweiligen experimentellen Ansätzen auf, die Erklärung für die vorhandenen Widersprüche sein könnten (s. 2.4.2). Ein Punkt, der nicht unbeachtet bleiben sollte, ist die Verwendung von unterschiedlichen Methoden zur Inaktivierung der Pilze. Man kann davon ausgehen, dass Ethanol, Hitze und Paraformaldehyd die Oberflächenstruktur der Pilze auf unterschiedliche Weise verändert, und somit die Stimulierbarkeit von Immuneffektorzellen beeinflusst. Insbesondere bei Untersuchungen zum *Oxidativen Burst* von Granulozyten wurden derartige Beobachtungen gemacht (Wozniok, 2007). Des Weiteren sind auch Zellzahlen, Konzentrationen und die Dauer der Stimulation nur selten miteinander vergleichbar.

Leider ist die Inaktivierung von Pilzen in vielen Fällen nicht zu vermeiden. Nur für kurze Inkubationszeiten (bis maximal 6 h), wie bei Untersuchungen zum *Oxidativen Burst* von Granulozyten (s. 4.8.2), ist es möglich, eine definierte Anzahl an Konidien

oder KS zu gewährleisten, da es ansonsten nach mehreren Stunden Kultivierung im Brutschrank zu einer starken Vermehrung der Pilze kommt, wenn diese frisch hergestellt verwendet werden. Ferner wurde kürzlich gezeigt, dass *A. fumigatus* verschiedene Virulenzfaktoren, wie z.B. Gliotoxin, ins Medium abgibt, welche Monozyten und DCs abtöten, und dadurch weitere Analysen unerwünscht beeinflussen kann (Stanzani *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde mittels *real-time* Mikroskopie (s. 4.6) nachgewiesen, dass eine sechsstündige Co-Kultivierung von frisch aufgetauten *A. fumigatus* KS und DCs in dieser Zeit kein unkontrolliertes Pilzwachstum nach sich zog.

Die meisten Experimente zur Identifikation von TLR2 und TLR4 als Rezeptoren für Pilze wurden im Maus-Modell durchgeführt. Mambula *et al.* zeigten 2002, dass TLR2 *knockout*-Mäuse, im Gegensatz zu TLR4 *knockout* Mäusen, mit einer verminderten Freisetzung von TNF- α auf *A. fumigatus* Konidien und Hyphen reagierten. Von Meier *et al.*, 2003 konnten diese Beobachtungen in dieser Form nicht bestätigt werden. Sowohl TLR2^{-/-}, als auch TLR4^{-/-} Mäuse zeigten eine verringerte TNF- α Produktion nach Stimulierung mit *A. fumigatus* Konidien und Hyphen. Eine mögliche Erklärung für diese Abweichungen könnte die unterschiedliche Verwendung von Hitze bzw. Ethanol-inaktivierten Pilzen sein.

Darüber hinaus scheinen die Beobachtungen aus der Maus nicht immer im vollen Umfang auf den Menschen übertragbar zu sein. Bisherige Arbeiten mit humanen Zellen deuteten darauf hin, dass *A. fumigatus* Hyphen Monozyten über TLR2 und TLR4 aktivieren (Wang *et al.*, 2001). Auch Netea *et al.* konnten für PBMCs zeigen, dass TLR2, nicht aber TLR4, durch Hyphen aktiviert werden. Anders im Fall von Konidien, die sowohl durch TLR2, als auch TLR4 erkannt werden. Insbesondere über TLR2 wird die Expression von anti-inflammatorischen Cytokinen (*IL-10*) induziert. Anhand dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Keimung von Konidien zu Hyphen einen Mechanismus zur Umgehung der Wirtsimmunantwort darstellt (Immun-Evasion). Dies scheint aufgrund der zahlreichen Widersprüche in der Literatur und aufgrund des geringen Verständnisses über das gesamte Spektrum an Cytokinen, die nach einer Pilzinfektion freigesetzt werden, nach wie vor spekulativ. Gezielte Untersuchungen mittels Microarray-Analysen und Cytokin ELISAs könnten hier Abhilfe schaffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass sich die Expression von TLR2 und TLR4 nach Co-Kultivierung mit *A. fumigatus* KS geringfügig veränderte (s. 4.6.2, 4.6.4). Im Gegensatz zu Monozyten konnten TLR2, und zum Teil auch TLR4, bei

DCs weder als membranständige Rezeptoren noch intrazellulär mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden (s. 4.2.2). Im Jahr 2001 hatten Visintin *et al.* ermittelt, dass bei DCs weniger als 75 TLR4 Moleküle / Zelle (im Vergleich zu Monozyten mit mehr als 1.000 Moleküle / Zelle) nachzuweisen waren, was an der Detektionsgrenze des Durchflusszytometers lag. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass sowohl TLR2, als auch TLR4 in sehr geringer Anzahl pro Zelle vorlagen, und das obwohl für beide Rezeptoren eine deutliche Expression mit dem *Light Cycler* ermittelt wurde (s. 4.2). An dieser Stelle sei angemerkt, dass die geringe Zahl an TLR4 und die gleichzeitige Abwesenheit von CD14 (s. 4.1.2) zu keiner abgeschwächten Reaktionsfähigkeit von DCs auf LPS führte (s. 4.7.3). Erst die Ausreifung zu mDCs verhindert auf LPS mit einer TNF- α Freisetzung zu reagieren (Visintin *et al.*, 2001).

Alle früheren Experimente gaben Anlass zu der Annahme, dass eine Aktivierung von DCs durch Pilze ebenfalls über TLR2 und TLR4 erfolgen könnte. Mit siRNAs gegen TLR2 bzw. TLR4 konnte die Expression des jeweiligen Gens reduziert werden. Im Gegensatz zur TLR2 siRNA Transfektion und Zymosan-Stimulation (s. 4.7.1) war es für TLR4 möglich, die Cytokinantwort nach TLR4 siRNA Transfektion und gleichzeitiger LPS-Gabe signifikant zu verringern (s. 4.7.3). Somit konnte eine Funktionalität des RNAi Systems für DCs nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es sich bei TLR4 um den Rezeptor für LPS handelte, wohingegen TLR2 nicht an der Erkennung von Zymosan beteiligt war. Wie spätere Experimente offenbarten, zeigten DCs eine deutliche Expression für Dectin-1, welcher die Rolle von TLR2 bei der Erkennung von Zymosan zu übernehmen schien (s. 5.6). Auch in der Maus konnte für Alveolar-Makrophagen nachgewiesen werden, dass die Erkennung von *A. fumigatus* ebenfalls nicht durch TLR2 und TLR4 vermittelt wird (Dubourdeau *et al.*, 2006).

Erwartungsgemäß führte der Kontakt mit *A. fumigatus* KS zu einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Cytokinen. Im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen war in denen mit TLR2 (s. 4.7.2) bzw. TLR4 siRNA (s. 4.7.4) nach Stimulation mit *A. fumigatus* KS keine Expressionsveränderung von TNF- α und IL-12 zu sehen. Auch durch den Einsatz von kommerziell erhältlichen TLR Antikörpern konnte eine Interaktion über TLR2 und TLR4 für DCs nicht nachgewiesen werden (s. 4.7.6). Im Gegensatz dazu war der durch Zymosan und *A. fumigatus* KS induzierte Oxidative Burst von Granulozyten vor allem dann reduziert, wenn die Zellen mit dem TLR2 Antikörper behandelt wurden (s. 4.8.2). Zusammenfassend aus diesen Beobachtungen wurde

geschlussfolgert, dass bei DCs TLR2 und TLR4 für die Erkennung von *A. fumigatus* KS eine eher untergeordnete Rolle spielen, wohingegen die Bildung von Sauerstoffradikalen von Granulozyten unter dem Einfluss von TLR2 zu stehen scheint.

5.6 Dectin-1 als Rezeptor für *A. fumigatus* KS auf DCs und Granulozyten

A. fumigatus KS stellen für DCs und PMNs einen stärkeren Stimulus dar als Konidien (s. 4.7.10 und 4.8.3). Es ist bekannt, dass es bei *A. fumigatus* im Zuge der Schwellung und Keimung von Konidien zu einer Veränderung in der Zellwandzusammensetzung kommt (Hohl *et al.*, 2005). Durch diesen Vorgang wird die Struktur von β -1,3 und β -1,6 Glucanen, aber auch von anderen Pilzantigenen verändert, was dazu führt, dass verschiedene Zustandsformen der Pilze vom Immunsystem unterschiedlich gut erkannt und beseitigt werden können (Steele *et al.*, 2006; Kurzai *et al.*, 2006).

Dectin-1 wurde als wichtiger Immunrezeptor beschrieben, der vor allem von myeloiden Zellen in den Lungen und des Gastrointestinaltraktes in hohem Grade exprimiert wird (Brown *et al.*, 2006). Hierbei handelt es sich um die zentralen Organe, die von Pilzen als Eintrittspforten in den menschlichen Körper für eine hämatogene Disseminierung benutzt werden. Nach direktem Kontakt zwischen β -1,3 Glukan und Dectin-1 wird ein Signal über zwei verschiedene Signal-Kaskaden (Syk-abhängig und Syk-unabhängig) in den Zellkern geleitet (Underhill *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2005). Die Co-Kultivierung von DCs mit *A. fumigatus* KS führte zu einer deutlichen Runterregulation von Card-9 (s. 4.7.11), ein erst kürzlich beschriebenes Adaptermolekül zur Signalweiterleitung nach Dectin-1 Aktivierung (Gross *et al.*, 2006). Warum keine verringerte Expression von *TNF- α* und *IL-12* nach Card-9 siRNA Transfektion zu verzeichnen war, kann nicht mit abschließender Sicherheit beantwortet werden. Eine mögliche Erklärung könnte die Verwendung anderer Adaptoren sein, so wie es auch für TLR4 MyD88-abhängige und unabhängige Signalwege gibt (s. 2.4.3). Kürzlich wurde gezeigt, dass Dectin-1 in Makrophagen und DCs die Transkriptionsfaktoren der NFAT Familie aktiviert, die wiederum die Expression von pro-inflammatorischen Cytokinen regulieren (Goodridge *et al.*, 2007; Rothfuchs *et al.*, 2007). Welche Signalwege hierbei im Detail beteiligt sind, wird sicherlich erst in den nächsten Jahren vollständig entschlüsselt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass die Pilz-induzierte Cytokin Freisetzung von DCs abhängig vom Dectin-1 Rezeptor ist. Dectin-1 wurde experimentell als Rezeptor dadurch bestätigt, dass eine Reduktion der *Dectin-1* Expression mittels siRNA zu einer verringerten Expression von *IL-12* und *TNF- α* führte (s. 4.7.9). Die Vorbehandlung von DCs mit einem spezifischen Antikörper gegen Dectin-1 hatte dazu geführt, dass es zu einer reduzierten Freisetzung von *TNF- α* , *IL-12* und *IL-6* nach Stimulation mit *A. fumigatus* KS, geschwollenen Konidien und Zymosan kam (s. 4.7.10). Ähnliche Entdeckungen wurden bei Mäusen gemacht, bei denen die Sekretion von *IL-6*, *TNF- α* und *MIP-2* durch einen Maus anti-Dectin-1 Antikörper blockiert werden konnte (Hohl *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2005).

Derselbe Antikörper hatte im Gegensatz zum TLR2 / TLR4 Antikörper die Sauerstoffradikalbildung von Granulozyten nach Pilz-Stimulation nicht verändert (s. 4.8.2). Dass Dectin-1 bei der Induktion des *Oxidativen Bursts* von Granulozyten dennoch eine Rolle spielt, zeigten Kennedy und Kollegen 2007. Durch Vorbehandlung der Zellen mit einem Antikörper gegen Dectin-1 konnte die durch Zymosan ausgelöste Produktion von Sauerstoffradikalen verringert werden. Aus diesen und eigenen Beobachtungen kann geschlussfolgert werden, dass der Oxidative Brust über verschiedene Immunrezeptoren und Signaltransduktionswege moduliert wird. Die Entschlüsselung von Signalwegen, welche angeborene und adaptive Immunmechanismen kontrollieren, kann neue Erfolge für anti-fungale Therapien bringen.

Seit kurzem werden β -Glucane als potente Aktivatoren des Immunsystems klinisch eingesetzt, um mikrobielle Infektionen und sogar Krebs zu behandeln (Chen und Seviour, 2007). Dabei moduliert Dectin-1 als Rezeptor für β -1,3 Glucane die anti-Tumor Aktivität (Ikeda *et al.*, 2007).

5.7 Einfluss von Immunsuppressiva auf DCs und Granulozyten

Bei Patienten, die sich einer Stammzelltransplantation unterziehen müssen, wird ihr eigenes Immunsystem zerstört und durch ein fremdes Immunsystem ersetzt. Zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen bekommen diese Patienten Immunsuppressiva, die das neue Immunsystem in seiner Funktion hemmen. Dadurch wird die Gefahr für Pilz- und Virusinfektionen nochmals vergrößert.

Im Rahmen der hier durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass das Reifungsverhalten von vollständig differenzierten DCs nicht wesentlich durch die Immunsuppressiva Cyclosporin A, Dexamethason, Cortison, MPA und RAD beeinflusst wird (s. 4.6.3). Werden Glucocorticoide allerdings bereits während des Beginns der Ausdifferenzierung von Monozyten gegeben, so wird eine vollständige Ausreifung zu DCs verhindert (Piemonti *et al.*, 1999).

Colic und Kollegen haben 2003 den Einfluss von MPA auf die Reifung von DCs untersucht, und dabei festgestellt, dass die Gabe von MPA am Tag 6 nach CD14-Isolation zu keiner reduzierten Expression von co-stimulatorischen Molekülen führt. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (s. 4.6.3). Ferner wurde mittels Microarray-Analysen nachgewiesen, dass es durch MPA zu keiner deutlichen Veränderung der Genexpression kam (s. 4.6.2). Im Gegensatz dazu hat eine frühe Beeinflussung der DC-Entwicklung zur Folge, dass ein Großteil der Zellen apoptotisch wird, und die überlebenden DCs derart negativ beeinflusst sind, dass keine ausreichende Aktivierung von T-Zellen mehr erfolgt (Colic *et al.*, 2003). Es kann spekuliert werden, ob die höhere Gefahr unter einer *A. fumigatus* Infektion zu leiden, durch einen zusätzlichen immunsuppressiven Effekt von MPA hervorgerufen wird, der sich auf eine Funktionsstörung von DCs zurückführen lässt.

Interessanterweise führte die Behandlung von Granulozyten mit MPA zu einem verstärkten *Oxidativen Burst* (s. 4.8.3). Fortführende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass es trotz der erhöhten Freisetzung an Sauerstoffradikalen zu keiner verbesserten Abtötungseffizienz von *A. fumigatus* KS kam (Wozniok, 2007).

Im Jahr 2006 wurde von Hohegger und Kollegen über einen Patienten nach Nierentransplantation berichtet, der nach der Erhöhung der Dosierung ein akutes entzündliches Syndrom entwickelte, das durch Fieber und Oligoarthritis gekennzeichnet war und vermutlich durch den *Oxidativen Burst* von Granulozyten ausgelöst wurde. Auch im Zusammenhang mit *A. fumigatus* gibt es Berichte, wonach die Gabe von MPA Patienten für eine IA empfänglicher machten (Schelenz und Goldsmith, 2003). Es kann spekuliert werden, ob es bei diesen Patienten zusätzlich zur Unterdrückung von DC-T-Zell-Antworten auch zu einer generalisierten Entzündung kommt. Aufgrund bisheriger Literaturangaben und eigenen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass die Behandlung mit MPA ein Risikofaktor für eine IA darstellt.

5.8 Genotypisierung von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für eine Infektion durch HCMV oder *A. fumigatus*

Am *Light Cycler* konnte durch den Einsatz von Hybridisierungs sonden und Schmelz kurvenanalysen eine Untersuchung von SNPs durchgeführt werden (s. 3.6.6). Dies stellte eine echte Alternative zur Sequenzierung und MALDI-TOF-Analyse dar, da Ergebnisse (im Idealfall) nach wenigen Stunden vorlagen.

Der *Light Cycler* und die MALDI-MS sind sensitive, exakte und reproduzierbare Methoden zur Genotypisierung von SNPs, die eine *Call-Rate* (Anzahl an DNA-Proben, die auswertbare Ergebnisse lieferten) von über 95% erreichten. Demgegenüber erzielte die Pyrosequenzierung lediglich eine *Call-rate* von knapp 80% (Löffler *et al.*, 2006). Daraus folgte, dass *Light Cycler* und MALDI-MS robuster und durch geringe DNA Qualität und Quantität weniger limitiert waren. Dieser Aspekt ist besonders wichtig, wenn, wie bei dieser Analyse, Proben von neutropenischen Patienten analysiert werden. Jedoch im Fall von Hochdurchsatz, sowie zur Identifizierung neuer SNPs, hat die Pyrosequenzierung den Vorteil der Simultanverarbeitung und Automatisierung (Ahmadian *et al.*, 2006). Eine Beschränkung dieser Methode ist durch sich eventuell auf der DNA befindlichen Histonkomplexe oder regulatorische Proteine gegeben (Soderback *et al.*, 2005).

Bei der Analyse des SNPs rs12709459 im *ITGB3* Gen wurde eine interessante Beobachtung gemacht: Gewöhnlich erfolgte die Quantifizierung im *Light Cycler* nach jedem PCR-Zyklus am Ende der jeweiligen Annealing-Phase. Allerdings konnte trotz sehr schönen Schmelzkurven, die bei einer Temperatur von 40°C begannen, kein PCR-Produkt während des PCR-Vorgangs quantifiziert werden. Diesem Phänomen wurde weiter nachgegangen und es stellte sich heraus, dass die für die PCR verwendete Annealingtemperatur von 60°C zu hoch gewählt war, damit sich die Sonden (nicht aber die Primer) an die Template-DNA anlagern konnten. Erst nach Absenkung der Annealingtemperatur auf 50°C war auch ein Amplifikat während der PCR quantifizierbar.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden SNPs in *IL-10*, *CCL2* und *CCR5* entdeckt, welche mit einem erhöhten Risiko für eine HCMV Reaktivierung bzw. Erkrankung assoziiert waren (Löffler *et al.*, 2006). HCMV hat verschiedene Strategien der Immunevasion

entwickelt, um eine lebenslang fortbestehende Infektion im Wirt sicherzustellen. Es ist bemerkenswert, dass HCMV dabei genau auf diese Gene abzielt, die in unserer Analyse mit einer erhöhten Empfänglichkeit verknüpft waren. So codiert HCMV für ein virales IL10 Homolog, womit zelluläre Immunantworten unterdrückt werden (Kotenko *et al.*, 2000). Zusätzlich wurden im viralen Genom vier Gene für Chemokin-Rezeptoren identifiziert, die CCL2 mit hoher Affinität binden und somit dessen Wirkung reduzieren (Casarosa *et al.*, 2005). Die Virus-vermittelte Runterregulation von CCR5 führt dazu, dass die Migration verschiedener Immuneffektorzellen zum Ort der Infektion verringert wird (Varani *et al.*, 2005). In wie weit die identifizierten SNPs in *IL-10*, *CCL2* und *CCR5* die Expression oder Aktivität verändern, muss durch fortführende, funktionelle Analysen näher bestimmt werden.

Eine neuere Untersuchung bei Patienten nach Lebertransplantation konnte einen SNP (rs5743708) in *TLR2* identifizieren, dessen Risikoallel zu einer höheren Viruslast beizutragen scheint (Kijpittayarit *et al.*, 2007). Patienten nach Nierentransplantation hingegen besitzen ein höheres HCMV-Risiko, wenn Stammzellen mit einem bestimmten Polymorphismus in *IL-10* (-1082 AA) übertragen werden (Alakulppi *et al.*, 2006). Eigene Arbeiten konnten einen solchen Zusammenhang für SNPs in *IL-10* (-1387 AG, -1117 AG, 1668 AT, 2068 CG) bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation bestätigen (Loeffler *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Untersuchungen gilt als gesichert, dass es eine genetische Prädisposition für die Empfänglichkeit von HCMV gibt.

Bei der in dieser Dissertation durchgeführten Genotypisierungsaktion konnten zwei weitere signifikante SNPs (-939, -139) im Promotor-Bereich des HCMV-Entry-Rezeptor-Gens *DC-SIGN* gefunden werden (s. 4.5). Während der Entwicklung von Monozyten zu DCs wird *DC-SIGN* in gut definierten Mikrodomänen auf der Plasmamembran exprimiert (Granelli-Piperno *et al.*, 2005). Diese Organisation scheint für eine Anlagerung und Internalisierung der Viruspartikel wichtig zu sein (Cambi und Figdor, 2003). Demgegenüber berichteten Geijtenbeek *et al.*, 2000, dass *DC-SIGN* nicht als Rezeptor für das *Virusentry* fungiert, sondern stattdessen eine Infektion weiterer Immunzellen vermittelt (trans-Rezeptor).

In einer ähnlichen Analyse wie in dieser Arbeit konnten zwei in der Nähe befindlichen SNPs (-871, -336) identifiziert werden, welche die Empfänglichkeit für *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose) beeinflussten (Barreiro *et al.*, 2006). Es gibt erste Hinweise darauf, dass das -336A Allel die Expression von *DC-SIGN* erhöht, und dadurch zu

einer verbesserten Pathogen-Erkennung und stärkeren adaptiven Immunantwort führt (Sakuntabhai *et al.*, 2005). Außerdem zeigten Babys, die dem Risiko für eine parenteral erworbene HIV-Infektion ausgesetzt waren, eine erhöhte Empfänglichkeit bei Vorhandensein des Risikoallels -336 G (Martin *et al.*, 2004).

Halary *et al.* waren 2002 in der Lage zu zeigen, dass das virale Hüllprotein gB ein Virusligand von DC-SIGN ist, und dadurch HCMV von DCs gebunden werden kann. Dies hatte uns zu eigenen Untersuchungen veranlaßt, in wie weit definierte Erbfaktoren in DC-SIGN mit unterschiedlichen Expressionsniveaus korrelieren würden. In der Tat konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Allele von rs735239 und rs4804803 die Expression von *DC-SIGN* beeinflussten. Die Personen, die für rs735240 (CC) und rs2287886 (AA) homozygot waren, wiesen eine höhere Expression im Vergleich zum TT GG Genotyp auf. Gleichzeitig war die Infektions-Empfänglichkeit von nach dem Zufallsprinzip ausgewählten gesunden Freiwilligen erhöht, wenn der Haplotyp CC AA vorlag. Durch IE-Immunfluoreszenzfärbungen konnte nachgewiesen werden, dass DCs mit dem CC AA Haplotyp in erheblich höherem Maße infizierbar waren, als DCs mit dem TT/GG Haplotyp (s. 4.5). Diese Beobachtungen geben einen starken Hinweis für eine Funktionswechselbeziehung zwischen den definierten Allelen in *DC-SIGN* und der Empfänglichkeit für HCMV.

Es ist unwahrscheinlich, dass Nukleotidaustausche die einzige Ursache für ein vergrößertes HCMV Risiko nach allogener Stammzelltransplantation sind. Die höhere Gefahr für eine HCMV Reaktivierung für serologisch positive Empfänger ist unumstritten (Meyers *et al.*, 1986), während der Einfluss des serologischen Status des Spenders nicht endgültig geklärt zu sein scheint (Grob *et al.*, 1987). In unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Analysen fanden wir keine Verbindung zwischen dem HCMV Status des Spenders und einer HCMV Reaktivierung bzw. Erkrankung. Jedoch waren eine akute GvHD ($p=0.042$), CD34-Selektion ($p=0.037$) und Behandlung mit Corticosteroiden ($p=0.023$) verbunden mit einem verstärkten Auftreten einer HCMV Krankheit.

Auch im Zusammenhang mit Pilzen gibt es eine zunehmende Anzahl an SNPs im menschlichen Genom, welche den Verlauf und den Ausgang von Infektionen mit *A. fumigatus* beeinflussen. Kesh und Kollegen deckten eine Verbindung zwischen einer IA und bestimmten SNPs in TLR1 und TLR6 auf, während keine Beteiligung gesuchter SNPs in TLR4 zu beobachten war (Kesh *et al.*, 2005). Desweiteren wurden definierte Allele im Mannan-bindenden Lectin (MBL) gefunden, die zum Verlauf einer

allergisch bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) beitragen (Kaur *et al.*, 2006; Vaid *et al.*, 2007). Weitere Untersuchungen von SNPs in C-Typ Lektinen führten zur Entschlüsselung eines genetischen Zusammenhanges zwischen Markern im *surfactant pulmonary-associated protein A2* Gen (*SFTPA2*) und einer ABPA (Madan *et al.*, 2005). Demgegenüber stehen bestimmte SNPs in *IL-10*, die eine protektive Wirkung in der Pathogenese einer IA besitzen (Seo *et al.*, 2005).

In unserer Arbeitsgruppe konnten SNPs in *IFN-γ* und *CXCL10* gefunden werden, die mit dem vermehrten Auftreten einer IA nach allogener Stammzelltransplantation assoziiert waren (s. 4.9). Zahlreiche Berichte zeigen, dass Polymorphismen in *IFN-γ* den Verlauf diverser Infektionskrankheiten beeinflussen (Chong *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). In unserer Studie, konnten wir aufdecken, dass das T Allel von rs2069705 in der Gruppe häufiger auftrat, die unter einer IA litt ($p=0.01$). Im Promotor von *CXCL10* befindet sich eine mögliche Bindungsstelle für *IFN-γ* in der Region zwischen Nukleotidpositionen -2002 und -930. Interessanterweise ist einer der analysierten Marker (rs4257674, -1101, $p = 0.001$) genau in dieser Genregion lokalisiert.

Die stärkste genetische Assoziation wurde für drei SNPs in *CXCL10* gefunden ($p<0.007$). Eine Haplotyp Analyse für rs1554013 (C/T), rs3921 (C/G), rs4859588 (A/G) und rs4257674 (A/G) bestätigte die Einzelmarker-Analyse und identifizierte „CGAG“ als das Risiko-Allel ($p = 0.008$). *CXCL10* ist ein Mediator des Immunsystems, der spezifisch die Migration von Th1-Zellen beeinflusst und die Adhäsion von T-Lymphozyten an Endothelzellen verstärkt (Loetscher *et al.*, 1996). Kürzlich wurde gezeigt, dass es im Rahmen einer IA zur Proliferation von Antigen-spezifischen T-Zellen kommt (Hebart *et al.*, 2002).

Indem die Expression von *CXCL10* in Monozyten, PMNs und DCs analysiert wurde, wurde eine durch *A. fumigatus* KS vermittelte Induktion bei Monozyten und DCs aufgedeckt (s. 4.9). DCs von Spendern, die homozygot für die Allelkombination TT GG AA waren, zeigte eine stärker induzierbare Expression von *CXCL10* als solche mit dem Haplotyp CC CC GG.

Schlussfolgernd gilt, dass eine Untersuchung von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation auf das Vorhandensein definierter Allele in *DC-SIGN* und *CXCL10* zu einer frühzeitigen Erkennung derjenigen Patienten beiträgt, die ein verstärktes Risiko für eine HCMV-Infektion bzw. IA haben.

6 Literaturverzeichnis

- Abe M, Thomson AW (2003)** Influence of immunosuppressive drugs on dendritic cells. *Transpl Immunol.* **11**: 357-365
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000)** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782-787
- Agrawal A, Agrawal S, Cao JN, Su H, Osann K, Gupta S (2007)** Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J Immunol.* **178**: 6912-6922
- Ahmadian A, Ehn M, Hober S (2006)** Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta.* **363**: 83-94
- Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H (2002)** Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* **32**: 1958-1968
- Akira S, Takeda K (2004)** Toll-like Receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**: 499-511
- Alakulppi NS, Kyllönen LE, Salo HM, Partanen J, Salmela KT, Laine JT (2006)** The impact of donor cytokine gene polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl Immunol.* **16**: 258-62
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001)** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**: 732-738
- Allison AC, Eugui EM (2005)** Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* **80**: 181-190
- Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C (1985)** Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**: 791-798
- Appay V, Rowland-Jones SL (2001)** RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* **22**: 83-87
- Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R 3rd, Kumamoto T, Edelbaum D, Morita A, Bergstresser PR, Takashima A (2000)** Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem.* **275**: 20157-20167
- Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ; Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2002)** Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis.* **34**: 7-14
- Ausubel FM (2005)** Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol.* **6**: 973-979
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000)** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811
- Banchereau J, Steinman RM (1998)** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 245-252
- Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Chee MS, Hutchison CA 3rd, Kouzarides T, Martignetti JA, Preddie E, et al. (1991)** The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq.* **2**: 1-12
- Barreiro LB, Neyrolles O, Babb CL, Tailleux L, Quach H, McElreavey K, Helden PD, Hoal EG, Gicquel B, Quintana-Murci L (2006)** Promoter variation in the *DC-SIGN*-encoding gene *CD209* is associated with tuberculosis. *PLoS Med.* **3**: 230-235
- Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB (2001)** Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9237-9242

- Baulcombe D (2004)** RNA silencing in plants. *Nature* **431**: 356-363
- Bellocchio S, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, Mosci P, Lipford GB, Pitzurra L, Romani L (2004)** TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol.* **173**: 7406-7415
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001)** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366
- Beutler B (2004)** Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**: 257-263
- Błach-Olszewska Z (2005)** Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol Ther Exp* **53**: 245-253
- Błaszczak J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL, Ji X (2001)** Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure (Camb)* **9**: 1225-1236
- Boehme KW, Compton T (2004)** Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J Virol.* **78**: 7867-7873
- Boehme KW, Guerrero M, Compton T (2006)** Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol.* **177**: 7094-7102
- Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, Jeannin P, Manfredi A, Mantovani A. (2006)** Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* **18**: 10-15
- Bozza S, Bistoni F, Gaziano R, Pitzurra L, Zelante T, Bonifazi P, Perruccio K, Bellocchio S, Neri M, Iorio AM, Salvatori G, De Santis R, Calvitti M, Doni A, Garlanda C, Mantovani A, Romani L (2006)** Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. *Blood* **108**: 3387-3396
- Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, di Francesco P, Romani L (2002)** Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J Immunol.* **168**: 1362-1371
- Bradley JR, Pober JS (2001)** Tumour necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* **20**: 6482-6491
- Braedel S, Radsak M, Einsele H, Latge JP, Michan A, Loeffler J, Haddad Z, Grigoleit U, Schild H, Hebart H (2004)** *Aspergillus fumigatus* antigens activate innate immune cells via toll-like receptors 2 and 4. *Br J Haematol.* **125**: 392-399
- Brown GD (2006)** Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol.* **6**: 33-43
- Brown GD, Gordon S (2001)** Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**: 36-37
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S (2003)** Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med.* **197**: 1119-1124
- Brown J, O'Callaghan CA, Marshall AS, Gilbert RJ, Siebold C, Gordon S, Brown GD, Jones EY (2007)** Structure of the fungal beta-glucan-binding immune receptor dectin-1: implications for function. *Protein Sci.* **16**: 1042-1052
- Burns S, Thrasher AJ (2004)** Dendritic cells: the bare bones of immunity. *Curr Biol.* **14**: 965-967
- Cambi A, Figdor CG (2003)** Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol.* **15**: 539-546
- Cambi A, Gijzen K, de Vries JM, Torensma R, Joosten B, Adema GJ, Netea MG, Kullberg BJ, Romani L, Figdor CG (2003)** The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol.* **33**: 532-538
- Cambi A, Koopman M, Figdor CG (2005)** How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol.* **7**: 481-488
- Caparros E, Munoz P, Sierra-Filardi E, Serrano-Gomez D, Puig-Kroger A, Rodriguez-Fernandez JL, Mellado M, Sancho J, Zubiaur M, Corbi AL (2006)** DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood* **107**: 3950-3958

- Caplen NJ (2004)** Gene therapy progress and prospects. Downregulating gene expression: the impact of RNA interference. *Gene Therapy* **11**: 1241-1248
- Carthew RW (2003)** RNAi applications in *Drosophila melanogaster*. In: RNAi, a guide to gene silencing. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Casarosa P, Waldhoer M, LiWang PJ, Vischer HF, Kledal T, Timmerman H, Schwartz TW, Smit MJ, Leurs R (2005)** CC and CX3C chemokines differentially interact with the N terminus of the human cytomegalovirus-encoded US28 receptor. *J Biol Chem*. **280**: 3275-3285
- Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C (2000)** Gene silencing in worms and fungi. *Nature* **404**: 245
- Celera Genomics Project (2001)** The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**: 1304-1351
- Chen J, Seviour R (2007)** Medicinal importance of fungal beta-(1->3), (1->6)-glucans. *Mycol Res*. **111**: 635-652
- Chong WP, Ip WK, Tso GH, Ng MW, Wong WH, Law HK, Yung RW, Chow EY, Au KL, Chan EY, Lim W, Peiris JS, Lau YL (2006)** The *interferon gamma* gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. *BMC Infect Dis*. **6**: 82
- Colic M, Stojic-Vukanic Z, Pavlovic B, Jandric D, Stefanoska I (2003)** Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. **134**: 63-69
- Compton T (2004)** Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol*. **14**: 5-8
- Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW (2003)** Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol*. **77**: 4588-4596
- Cortez KJ, Lyman CA, Kottlil S, Kim HS, Roilides E, Yang J, Fullmer B, Lempicki R, Walsh TJ (2006)** Functional genomics of innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. **74**: 2353-2365
- Dennehy KM, Brown GD (2007)** The role of the {beta}-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol*. **82**: 1-6
- Doni A, Peri G, Chieppa M, Allavena P, Pasqualini F, Vago L, Romani L, Garlanda C, Mantovani A (2003)** Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur J Immunol*. **33**: 2886-2893
- Dostert C, Tschopp J (2007)** DEctINg fungal pathogens. *Nat Immunol*. **8**: 17-18
- Douglas CM (2006)** Understanding the microbiology of the *Aspergillus* cell wall and the efficacy of caspofungin. *Med Mycol*. **44**: 95-99
- Dubourdeau M, Athman R, Balloy V, Huerre M, Chignard M, Philpott DJ, Latgé JP, Ibrahim-Granet O (2006)** *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J Immunol*. **177**: 3994-4001
- Dunne A, Ejdeback M, Ludidi PL, O'Neill LA, Gay NJ (2003)** Structural complementarity of Toll/Interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* **278**: 41443-41451
- Duperrier K, Farre A, Bienvenu J, Bleyzac N, Bernaud J, Gebuhrer L, Rigal D, Eljaafari A (2002)** Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF-alpha or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L. *J Leukoc Biol*. **72**: 953-961
- East L, Isacke CM (2002)** The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta*. **1572**: 364-386
- Einsele H, Hebart H (2002)** Cellular immunity to viral and fungal antigens after stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. **9**: 485-489
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001)** RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs. *Genes Dev* **15**: 188-200
- Feire AL, Koss H, Compton T (2004)** Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 15470-15475

- Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ (2002)** C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol.* **2**: 77-84
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811
- Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M, LeMOlne J, Vorgias CE, Diaquin M, Latge JP (2000)** Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall *J Biol Chem.* **275**: 27594-27607
- Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, Hube B (2005)** Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol.* **56**: 397-415
- Gafa V, Lande R, Gagliardi MC, Severa M, Giacomini E, Remoli ME, Nisini R, Ramoni C, Di Francesco P, Aldebert D, Grillot R, Coccia EM (2006)** Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response. *Infect Immun.* **74**: 1480-1489
- Gafa V, Remoli ME, Giacomini E, Gagliardi MC, Lande R, Severa M, Grillot R, Coccia EM (2007)** *In vitro* infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment. *Microbes Infect.* **9**: 971-980
- Gandhi MK, Khanna R (2004)** Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis.* **4**: 725-738
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM (2003)** Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med.* **197**: 1107-1117
- Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM (2005)** Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* **24**: 1277-1286
- Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, Maccagno A, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, De Santis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Romani L, Mantovani A (2002)** Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* **420**: 182-186
- Gaziano R, Bozza S, Bellocchio S, Perruccio K, Montagnoli C, Pitzurra L, Salvatori G, De Santis R, Carminati P, Mantovani A, Romani L (2004)** Anti-*Aspergillus fumigatus* efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**: 4414-4421
- Gebhardt F (2004)** Analyse der Toll-like-Rezeptor vermittelten Immunantwort in unreifen dendritischen Zellen nach Infektion mit *Aspergillus fumigatus* oder dem humanen Cytomegalievirus. *Diplomarbeit Universität Tübingen*
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG (2000)** Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**: 575-585
- Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, Dudoit S (2005)** Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor. *Springer, New York*
- Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA (2006)** Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol.* **176**: 3717-3724
- Gibson NJ (2006)** The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta.* **363**: 32-47
- Gibson W (1996)** Structure and assembly of the virion. *Intervirology* **39**: 389-400
- Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM (2007)** Dectin-1 Stimulation by *Candida albicans* Yeast or Zymosan Triggers NFAT Activation in Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol.* **178**: 3107-3115
- Graneli-Piperno A, Pritsker A, Pack M, Shimeliovich I, Arrighi JF, Park CG, Trumpfheller C, Piguet V, Moran TM, Steinman RM (2005)** Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol.* **175**: 4265-4273

- Grigoleit U, Riegler S, Einsele H, Laib Sampaio K, Jahn G, Hebart H, Brossart P, Frank F, Sinzger C (2002)** Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells. *Br J Haematol.* **119**: 189-198
- Grob JP, Grundy JE, Prentice HG, Griffiths PD, Hoffbrand AV, Hughes MD, Tate T, Wimperis JZ, Brenner MK (1987)** Immune donors can protect marrow-transplant recipients from severe cytomegalovirus infections. *Lancet* **1**: 774-776
- Gross O, Gewies A, Finger K, Schafer M, Sparwasser T, Peschel C, Forster I, Ruland J. (2006)** Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**: 651-656
- Grunebach F, Weck MM, Reichert J, Brossart P (2002)** Molecular and functional characterization of human Dectin-1. *Exp Hematol.* **30**: 1309-1315
- Gunzer M, Weishaupt C, Hillmer A, Basoglu Y, Friedl P, Dittmar KE, Kolanus W, Varga G, Grabbe S (2004)** A spectrum of biophysical interaction modes between T cells and different antigen-presenting cells during priming in 3-D collagen and in vivo. *Blood* **104**: 2801-2809
- Guo S, Kempthues K (1995)** *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**: 611-620
- Hackstein H, Thomson AW (2004)** Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol.* **4**: 24-34
- Haddad Z (2006)** Monocytic cell responses to *Aspergillus fumigatus*: Investigation of phagocytosis, gene expression and peptide presentation. *Dissertation Universität Tübingen*
- Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houles C, Fieschi F, Arenzana-Seisdedos F, Moreau JF, Dechanet-Merville J (2002)** Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* **17**: 653-664
- Hannon GJ (2002)** RNA interference. *Nature* **418**: 244-251
- Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, Imanishi T, Xue L, Morris SW, Inui M, Takai T, Shibuya A, Saijo S, Iwakura Y, Ohno N, Koseki H, Yoshida H, Penninger JM, Saito T (2007)** The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol.* **8**: 619-629
- Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. (2002)** Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. *Genes Immun.* **3**: 313-330
- Hayashi F, Means TK, Luster AD (2003)** Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**: 2660-2669
- Hebart H, Bollinger C, Fisch P, Sarfati J, Meisner C, Baur M, Loeffler J, Monod M, Latge JP, Einsele H (2002)** Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood* **100**: 4521-4528
- Hebart H, Einsele H (2004)** Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol.* **65**: 432-436
- Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. (2003)** The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* **33**: 2987-2997
- Herbrecht R, Moghaddam A, Mahmal L, Natarajan-Ame S, Fornecker LM, Letscher-Bru V. (2005)** Invasive aspergillosis in the hematologic and immunologic patient: new findings and key questions in leukemia. *Med Mycol.* **43**: 239-242
- Hochegger K, Gruber J, Lhotta K (2006)** Acute inflammatory syndrome induced by mycophenolate mofetil in a patient following kidney transplantation. *Am J Transplant.* **6**: 852-854
- Hochrein H, O'Keeffe M, Wagner H (2002)** Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol.* **63**: 1103-1110
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B (2004)** The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* **5**: 971-974
- Hohl TM, Rivera A, Pamer EG (2006)** Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol.* **18**: 465-472

- Hohl TM, Van Epps HL, Rivera A, Morgan LA, Chen PL, Feldmesser M, Pamer EG (2005) *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog.* **1**: 30
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* **168**: 4531-4537
- Huber W, von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M (2002) Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* **18**: 96-104
- Ikeda Y, Adachi Y, Ishii T, Tamura H, Aketagawa J, Tanaka S, Ohno N (2007) Blocking effect of anti-Dectin-1 antibodies on the anti-tumor activity of 1,3-beta-glucan and the binding of Dectin-1 to 1,3-beta-glucan. *Biol Pharm Bull.* **30**: 1384-1389
- Imler JL, Hoffmann JA (2000) Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Opin Microbiol* **3**: 16-22
- Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, Germain RN, Mellman I, Steinman RM (2000) The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* **191**: 927-936
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921
- Isaacson MK, Feire AL, Compton T (2007) Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J Virol.* **81**: 6241-6247
- Ishitani T, Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Shibuya H, Gaynor RB, Matsumoto K (2003) Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *EMBO J* **22**: 6277-6288
- Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune response. *Nature Immunol* **5**: 987-995
- Izquierdo M (2005) Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy* **12**: 217-227
- Jacobs BL, Langland JO (1996) When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**: 339-349
- Jahn G, Plachter B (1993) Diagnostics of persistent viruses: human cytomegalovirus as an example. *Intervirology* **35**: 60-72
- Jahn G, Stenglein S, Riegler S, Einsele H, Sinzger C (1999) Human cytomegalovirus infection of immature dendritic cells and macrophages. *Intervirology* **42**: 365-372
- Janssens S, Beyaert R (2003) Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* **11**: 293-302
- Jarvis MA, Nelson JA (2002) Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 403-407
- Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR (2000) Lipopolysaccharide induce physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nucleus translocation of NF-kappa B. *J Immunol* **165**: 3541-3544
- Johnson MR, Wang K, Smith JB, Heslin MJ, Diasio RB (2000) Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* **278**: 175-184
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* **194**: 863-869
- Kaisho T, Akira S (2006) Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol.* **117**: 979-987
- Kanazawa N (2007) Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J Dermatol Sci.* **45**: 77-86

- Kariko K, Bhuyan P, Capodici J, Weissman D (2004)** Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol.* **172**: 6545-6549
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000)** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NFκB activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663
- Kaur S, Gupta VK, Shah A, Thiel S, Sarma PU, Madan T (2006)** Elevated levels of mannan-binding lectin (MBL) and eosinophilia in patients of bronchial asthma with allergic rhinitis and allergic bronchopulmonary aspergillosis associate with a novel intronic polymorphism in MBL. *Clin Exp Immunol.* **143**: 414-419
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999)** Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**: 115-122
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S (2001)** Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* **167**: 5887-5894
- Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I (1983)** Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J Biochem* **94**: 937-947
- Kennedy AD, Willment JA, Dorward DW, Williams DL, Brown GD, Deleo FR (2007)** Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur J Immunol.* **37**: 467-478
- Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, Jaffe D, Hsu K, VAN DEN Brink M, O'reilly R, Pamer E, Satagopan J, Papanicolaou GA (2005)** TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* **1062**: 95-103
- Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR (2007)** Relationship between *Toll-like receptor 2* polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis.* **44**: 1315-1320
- Kim HS, Choi EH, Khan J, Roilides E, Francesconi A, Kasai M, Sein T, Schaufele RL, Sakurai K, Son CG, Greer BT, Chanock S, Lyman CA, Walsh TJ (2005)** Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*. *Infect Immun.* **73**: 3714-3724
- Koch O, Rockett K, Jallow M, Pinder M, Sisay-Joof F, Kwiatkowski D (2005)** Investigation of malaria susceptibility determinants in the *IFNG/IL26/IL22* genomic region. *Genes Immun.* **6**: 312-318
- Kotenko SV, Sacconi S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S (2000)** Human cytomegalovirus harbors its own unique IL10 homolog (cmvIL10). *Proc Natl Acad Sci USA* **15**: 1695-1700
- Koy C, Mikkat S, Raptakis E, Sutton C, Resch M, Tanaka K, Glocker MO (2003)** Matrix-assisted laser desorption/ionization- quadrupole ion trap-time of flight mass spectrometry sequencing resolves structures of unidentified peptides obtained by in-gel tryptic digestion of haptoglobin derivatives from human plasma proteomes. *Proteomics* **3**: 851-858
- Krauter J, Gorlich K, Ottmann O, Lubbert M, Dohner H, Heit W, Kanz L, Ganser A, Heil G (2003)** Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol.* **21**: 4413-4422
- Kurzai O, Schmitt C, Brocker E, Frosch M, Kolb-Maurer A (2005)** Polymorphism of *Candida albicans* is a major factor in the interaction with human dendritic cells. *Int J Med Microbiol.* **295**: 121-127
- Latgé JP (1999)** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* **12**: 310-350
- Latgé JP (2001)** The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* **9**: 382-389
- Lee JI, Ganster RW, Geller DA, Burckart GJ, Thomson AW, Lu L (1999)** Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on *in vitro*-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B. *Transplantation* **68**: 1255-1263
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996)** The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973-983
- Levitz SM (2004)** Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes Infect.* **6**: 1351-1355

- Ley K, Kansas GS (2004)** Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol.* **4**: 325-335
- Li J, Feng ZH, Li GY, Mou DL, Nie QH (2006)** Expression of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin on dendritic cells generated from human peripheral blood monocytes. *World J Gastroenterol.* **12**: 453-456
- Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H (2002)** IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5567-5572
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991)** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**: 807-815
- Liu YJ (2001)** Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**: 259-262
- Loeffler J, Steffens M, Arlt EM, Toliat MR, Mezger M, Suk A, Wienker TF, Hebart H, Nurnberg P, Boeckh M, Ljungman P, Trenschele R, Einsele H (2006)** Polymorphisms in the genes encoding *chemokine receptor 5*, *interleukin-10*, and *monocyte chemoattractant protein 1* contribute to cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol.* **44**: 1847-1850
- Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B (1996)** Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med.* **184**: 963-969
- Luther K, Torosantucci A, Brakhage AA, Heesemann J, Ebel F (2007)** Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell Microbiol.* **9**: 368-381
- Madan T, Kaur S, Saxena S, Singh M, Kishore U, Thiel S, Reid KB, Sarma PU (2005)** Role of collectins in innate immunity against aspergillosis. *Med Mycol.* **43**: 155-163
- Maine EM (2000)** A conserved mechanism for post-transcriptional gene silencing. *Genome Biol* **1**: 1018-1022
- Marques JT, Williams BR (2005)** Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat Biotechnol.* **23**: 1399-1405
- Martin MP, Lederman MM, Hutcheson HB, Goedert JJ, Nelson GW, van Kooyk Y, Detels R, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M (2004)** Association of *DC-SIGN* promoter polymorphism with increased risk for parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* **78**: 14053-14056
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T (2002)** Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**: 563-574
- Martinez J, Tuschl T (2004)** RISC is a phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* **18**: 975-980
- Matsue H, Yang C, Matsue K, Edelbaum D, Mummert M, Takashima A (2002)** Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporin A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation. *J Immunol.* **169**: 3555-3564
- Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T (2003)** Subcellular localization of toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* **171**: 3154-3162
- McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, Warnock DW (2001)** Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis.* **33**: 641-647
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997)** A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-397
- Mehling A, Grabbe S, Voskort M, Schwarz T, Luger TA, Beissert S (2000)** Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *J Immunol.* **165**: 2374-2381
- Meier A, Kirschning CJ, Nikolaus T, Wagner H, Heesemann J, Ebel F (2003)** Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol.* **5**: 561-570

- Meister G, Tuschl T (2004)** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343-349
- Mello CC, Conte D Jr (2004)** Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**: 338-342
- Meshulam T, Levitz SM, Christin L, Diamond RD (1995)** A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT). *J Infect Dis.* **172**: 1153-1156
- Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED (1986)** Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis* **153**: 478-488
- Miyake K (2006)** Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res.* **12**: 195-204
- Mocellin S, Provenzano M (2004)** RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *J Transl Med* **2**: 1-6
- Modrow S, Falke D (2002)** Molekulare Virologie. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin*, 2. Auflage
- Mogensen TH, Paludan SR (2005)** Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors. *J Mol Med* **83**: 180-192
- Moynagh PN (2005)** TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol.* **26**: 469-476
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A (2000)** Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**: 5998-6004
- Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K (2003)** Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* **171**: 3977-3982
- Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ (2004, 1)** Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol.* **172**: 3712-3718
- Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ (2004, 2)** Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **23**: 672-676
- Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ (2002)** The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis.* **185**: 1483-1489
- Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, Andresen T, Verweij PE, Kullberg BJ (2003)** *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis.* **188**: 320-326
- Novina CD, Sharp PA (2004)** The RNAi revolution. *Nature* **430**: 161-164
- Oda K, Kitano H (2006)** A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Mol Syst Biol.* 1-20
- Paddison PJ, Silva JM, Conklin DS, Schlabach M, Li M, Aruleba S, Balija V, O'Shaughnessy A, Gnoj L, Scobie K, Chang K, Westbrook T, Cleary M, Sachidanandam R, McCombie WR, Elledge SJ, Hannon GJ (2004)** A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* **428**: 427-431
- Phadke AP, Mehrad B (2005)** Cytokines in host defense against *Aspergillus*: recent advances. *Med Mycol.* **43**: 173-176
- Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, Succi C, Di Carlo V (1999)** Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol.* **162**: 6473-6481
- Pietro Paolo RL, Compton T (1997)** Direct interaction between human cytomegalovirus glycoprotein B and cellular annexin II. *J Virol.* **71**: 9803-9807

- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998)** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *TLR4* gene. *Science* **282**: 2085-2088
- Prechtel AT, Turza NM, Theodoridis AA, Kummer M, Steinkasserer A (2006)** Small interfering RNA (siRNA) delivery into monocyte-derived dendritic cells by electroporation. *J Immunol Methods*. **311**: 139-152
- Quinn MT, Gauss KA (2004)** Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol*. **76**: 760-781
- Quinnan GV Jr, Delery M, Rook AH, Frederick WR, Epstein JS, Manischewitz JF, Jackson L, Ramsey KM, Mittal K, Plotkin SA, et al. (1984)** Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and a nonattenuated strain of cytomegalovirus. *Ann Intern Med*. **101**: 478-483
- Radsak MP, Salih HR, Rammensee HG, Schild H (2004)** Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival. *J Immunol*. **172**: 4956-4963
- Reed LJ Münch H (1938)** A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**: 493-497
- Reis e Sousa C (2004)** Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol*. **16**: 27-34
- Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM (1993)** Phagocytosis of antigens by Langerhans cells *in vitro*. *J Exp Med* **178**: 509-519
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998)** A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 588-593
- Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC (2004)** Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol*. **42**: 485-498
- Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis e Sousa C (2005)** Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**: 507-517
- Romani L (2004)** Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. **4**: 1-23
- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G (1996)** Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Meth* **196**: 137-151
- Rothfuchs AG, Bafica A, Feng CG, Egen JG, Williams DL, Brown GD, Sher A (2007)** Dectin-1 Interaction with Mycobacterium tuberculosis Leads to Enhanced IL-12p40 Production by Splenic Dendritic Cells. *J Immunol*. **179**: 3463-3471
- Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, Kalayanaroj SM, Tangnararatchakit K, Tangthawornchaikul N, Vasanawathana S, Chaiyaratana W, Yenchitsomanus PT, Suriyaphol P, Avirutnan P, Chokephaibulkit K, Matsuda F, Yoksan S, Jacob Y, Lathrop GM, Malasit P, Despres P, Julier C (2005)** A variant in the *CD209* promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet*. **37**: 507-513
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A (1995)** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**: 389-400
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Sauer S (2006)** Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications. *Clin Chim Acta* **363**: 95-105
- Schelenz S, Goldsmith DJ (2003)** *Aspergillus* endophthalmitis: an unusual complication of disseminated infection in renal transplant patients. *J Infect*. **47**: 336-343
- Scherr M, Steinmann D, Eder M (2004)** RNA interference (RNAi) in hematology. *Ann Hematol* **83**: 1-8

- Schroder NW, Schumann RR (2005)** Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis.* **5**: 156-164
- Seo KW, Kim DH, Sohn SK, Lee NY, Chang HH, Kim SW, Jeon SB, Baek JH, Kim JG, Suh JS, Lee KB (2005)** Protective role of interleukin-10 promoter gene polymorphism in the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **36**: 1089-1095
- Serrano-Gomez D, Dominguez-Soto A, Ancochea J, Jimenez-Heffernan JA, Leal JA, Corbi AL (2004)** Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol.* **173**: 5635-5643
- Serrano-Gomez D, Leal JA, Corbi AL (2005)** DC-SIGN mediates the binding of *Aspergillus fumigatus* and keratinophilic fungi by human dendritic cells. *Immunobiology* **210**: 175-183
- Severa M, Remoli ME, Giacomini E, Ragimbeau J, Lande R, Uze G, Pellegrini S, Coccia EM (2006)** Differential responsiveness to IFN-alpha and IFN-beta of human mature DC through modulation of IFNAR expression. *J Leukoc Biol.* **79**: 1286-1294
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M (1999)** MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* **189**: 1777-1782
- Shlomai A, Shaul Y (2004)** RNA interference – small RNAs effectively fight viral hepatitis. *Liver Int.* **24**: 526-531
- Silva J, Chang K, Hannon GJ, Rivas FV (2004)** RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene* **23**: 8401-8409
- Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, Raybuck SA, Chambers SP, Caron PR, Murcko MA, Wilson KP (1996)** Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cel.* **85**: 921-930
- Sinzger C, Schmidt K, Knapp J, Kahl M, Beck R, Waldman J, Hebart H, Einsele H, Jahn G (1999)** Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *J Gen Virol.* **80**: 2867-2877
- Sioud (2005)** Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol.* **348**: 1079-1090
- Sissons JG, Carmichael AJ, McKinney N, Sinclair JH, Wills MR (2002)** Human cytomegalovirus and immunopathology. *Springer Semin Immunopathol.* **24**: 169-185
- Smyth GK, Yang YH, Speed TP (2003)** Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods in Molecular Biology* **224**:111-136
- Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A (1997)** Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* **136**: 1007-1021
- Soderback E, Zackrisson AL, Lindblom B, Alderborn A (2005)** Determination of *CYP2D6* gene copy number by pyrosequencing. *Clin Chem* **51**: 522-531
- Stanzani M, Orciuolo E, Lewis R, Kontoyiannis DP, Martins SL, St John LS, Komanduri KV (2005)** *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood.* **105**: 2258-2265
- Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, Kolls JK, Brown GD (2005)** The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **1**: 42
- Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. (2004)** Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3516-3521
- Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, Du X, Georgel P, Crozat K, Mudd S, Mann N, Sovath S, Goode J, Shamel L, Herskovits AA, Portnoy DA, Cooke M, Tarantino LM, Wiltshire T, Steinberg BE,**

- Grinstein S, Beutler B (2006)** The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol.* **7**: 156-164
- Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K (2000)** TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* **5**: 649-658
- Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB (2003)** TAK1 is critical for I κ B kinase-mediated activation of the NF κ B pathway. *J Mol Biol.* **326**: 105-115
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003)** Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-376
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S (2002)** Cutting edge: Role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**: 10-14
- The International SNP Map Working (2001)** A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**: 928-933
- Tosi MF (2005)** Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol.* **116**: 241-249
- Ulevitch RJ, Tobias PS (1999)** Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune response. *Curr Opin Immunol* **11**: 19-22
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A (1999)** The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**: 811-815
- Underhill DM, Rossnagle E, Lowell CA, Simmons RM (2005)** Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* **106**: 2543-2550
- Vaid M, Kaur S, Sambatakou H, Madan T, Denning DW, Sarma PU (2007)** Distinct alleles of mannose-binding lectin (MBL) and surfactant proteins A (SP-A) in patients with chronic cavitary pulmonary aspergillosis and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin Chem Lab Med.* **45**: 183-186
- Varani S, Frascaroli G, Homman-Loudiyi M, Feld S, Landini MP, Soderberg-Naucler C (2005)** Human cytomegalovirus inhibits the migration of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR1 and CCR5. *J Leukoc Biol.* **77**: 219-228
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM (2001)** Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* **166**: 249-255
- Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ (2003)** Differential adaptor utilization by Toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv.* **3**: 466-477
- Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA (1997)** Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis.* **175**: 1459-1466
- Wang JE, Warris A, Ellingsen EA, Jorgensen PF, Flo TH, Espevik T, Solberg R, Verweij PE, Aasen AO (2001)** Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect Immun.* **69**: 2402-2406
- Wang X, Huang DY, Huang SM, Huang ES (2005)** Integrin α v β 3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med.* **11**: 515-521
- Wang X, Huang SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES (2003)** Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**: 456-461
- Williams IR (2006)** CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* **1072**: 52-61
- Willment JA, Marshall AS, Reid DM, Williams DL, Wong SY, Gordon S, Brown GD (2005)** The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol.* **35**: 1539-1547
- Wintergerst E, Manz-Keinke H, Plattner H, Schlepper-Schafer J (1989)** The interaction of a lung surfactant protein (SP-A) with macrophages is mannose dependent. *Eur J Cell Biol.* **50**: 291-298
- Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, Paul LC, Daha MR, van Kooten C (2000)** The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol.* **30**: 1807-1812

- Wozniok I (2007)** Interaktion von humanen neutrophilen Granulozyten mit *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans*. *Dissertation Universität Würzburg / Stuttgart (unveröffentlicht)*
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990)** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**: 1431-1433
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003)** Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**: 640-643
- Zelante T, Montagnoli C, Bozza S, Bellocchio S, Bonifazi P, De Luca A, Bistoni G, Mosci P, Romani L (2006)** Manipulating immunity against *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol.* **44**: 237-243
- Zhang B, Schmoyer D, Kirov S, Snoddy J (2004)** GOTree Machine (GOTM): a web-based platform for interpreting sets of interesting genes using Gene Ontology hierarchies. *BMC Bioinformatics* **5**: 16
- Zhang J, Noguchi E, Migita O, Yokouchi Y, Nakayama J, Shibasaki M, Arinami T (2005)** Association of a haplotype block spanning SDAD1 gene and CXC chemokine genes with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* **115**: 548-554

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

α	anti
A	Adenin oder <i>antisense</i> (Primer)
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
as	<i>antisense</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
bp	Basenpaare (<i>base pair</i>)
bidest.	zweifach destilliert
BMDC	<i>bone marrow-derived DC</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
ca.	circa
CD	Differenzierungsfaktor (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	<i>copy DNA</i>
CLR	C-Typ Lektin Rezeptor
CMV	Cytomegalievirus
CP	<i>Crossing-Point</i>
CPE	Cytopathischer Effekt
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
C-terminal	carboxyterminal
d/v	dorso/ventral
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
e	Eulersche Zahl ($e=2,7182$)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
EtOH	Ethanol
ExoI	Exonuclease I
F	<i>forward</i> (Primer)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FSC	<i>forward scattering</i>
G	Guanin

gB	Glykoprotein B
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
GOF	Gewinnmutation (<i>gain of function</i>)
H ₂ O	Wasser
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HEK293	Humane Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cell</i>)
HFF	humane Vorhautfibroblasten (<i>human foreskin fibroblasts</i>)
HHV	humanes Herpesvirus
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HSV	Herpes simplex Virus
IA	invasive Aspergillose
ICP	<i>infected cell protein</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
iDC	unreife dendritische Zelle (<i>immature dendritic cell</i>)
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRL	<i>internal repeat long</i>
IRS	<i>internal repeat short</i>
IS	Immunsuppressiva
ISG	<i>interferon stimulated genes</i>
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KS	Keimschläuche
LC	<i>Light Cycler</i> ®
LOF	Verlustmutation (<i>loss of function</i>)
LPB	LPS-bindendes Protein (<i>LPS-binding protein</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Region (<i>leucine-rich repeat</i>)
luc	Luciferase
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>magnetic cell sorting</i>)
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
MBP	<i>Mannose-binding protein</i>
MCMV	Murines Cytomegalievirus
mDC	reife dendritische Zelle (<i>mature dendritic cell</i>)
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Mio	Million
miRNA	<i>micro RNA</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MS	Massenspektrometrie
MT	Mikrotiterplatte
myDC	myeloide dendritische Zelle
NaCl	Natriumchlorid

NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NBT	Nitro blue tetrazolium
n.d.	nicht ermittelt (<i>not determined</i>)
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non-essential amino acids</i>)
NK	Natürliche Killerzelle (<i>natural killer cell</i>)
Nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophil</i>
pp65	Phosphoprotein 65
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTGS	<i>post transcriptional gene silencing</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
R	<i>reverse</i> (Primer)
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute - Medium</i>
rs	<i>reference SNP</i>
RT	Raumtemperatur

S	<i>sense</i> (Primer)
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SI	<i>système international</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	Einzelbasenpolymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SP	<i>surfactant protein</i>
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
SSC	<i>side scattering</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIR	Toll/IL1-Rezeptor Domäne (<i>Toll-Interleukin (IL)-1 resistance</i>)
TLR	Toll-like Rezeptor
TOF	<i>time of flight</i>
TRS	<i>terminal repeat short</i>
TRL	<i>terminal repeat long</i>
U	Uracil
UL	<i>unique long</i>
üN	über Nacht
US	<i>unique small</i>
VP	Virionprotein

Tabelle 36: Abkürzungsliste.

7.2 Einheiten

°C	Grad Celsius
μ	mikro-
A	Ampère
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	milli-
M	Molar
min	Minute
n	nano-
s	Sekunde
V	Volt

Tabelle 37: Auflistung der für diese Arbeit wichtigen Einheiten.

7.3 Genbezeichnungen

Abkürzung	Genbezeichnung / Alias
<i>Card-9</i>	<i>Caspase recruitment domain family, member 9</i>
<i>CCL5</i>	<i>Chemokine ligand 5 (Rantes)</i>
<i>CCL20</i>	<i>Chemokine ligand 20 (MIP-3α)</i>
<i>CCR5</i>	<i>Chemokine receptor 5</i>
<i>CD14</i>	<i>Cluster of differentiation 14</i>
<i>CXCL10</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)</i>
<i>CXCL11</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL11)</i>
<i>DC-SIGN</i>	<i>Dendritic cell specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 grabbing nonintegrin (CD209)</i>
<i>Dectin-1</i>	<i>Dendritic cell-associated C-type lectin 1 (CLEC7A)</i>
<i>EGFR</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<i>h-ALAS</i>	<i>Human δ-aminolevulinat synthase</i>
<i>IFN-α/β</i>	<i>Interferon-α/β</i>
<i>IKK</i>	<i>Inhibitor of nuclear factor-κB (IκB)-kinase</i>
<i>ICAM-3</i>	<i>Intercellular adhesion molecule 3</i>
<i>IL-6/8/10/12</i>	<i>Interleukin-6/8/10/12</i>
<i>IL-1R</i>	<i>Interleukin-1 receptor</i>
<i>INHBA</i>	<i>Inhibin beta A</i>
<i>IRAK</i>	<i>IL-1R-associated kinase</i>
<i>IRF3</i>	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
<i>ITGB3</i>	<i>Integrin β3</i>
<i>IκB</i>	<i>Inhibitor of NFκB</i>
<i>Mal</i>	<i>MyD88 adapter-like (TIRAP)</i>
<i>MBL</i>	<i>Mannose-binding lectin</i>
<i>MD-2</i>	<i>Lymphocyte antigen 96 (LY-96)</i>
<i>MyD88</i>	<i>Myeloid differentiation primary-response gene 88</i>
<i>NEMO</i>	<i>NFκB essential modulator (IKK-γ)</i>
<i>NFκB</i>	<i>Nuclear factor κ B</i>
<i>PTX-3</i>	<i>Pentraxin-3</i>
<i>SDC2</i>	<i>Syndecan 2</i>
<i>SFTPA2</i>	<i>surfactant pulmonary-associated protein A2</i>
<i>SLC16A10</i>	<i>solute carrier family 16 member 10</i>
<i>TAB</i>	<i>TAK1-binding protein</i>
<i>TAK</i>	<i>Transforming-growth-factor-β-activated kinase</i>
<i>THBS1</i>	<i>Thrombospondin 1</i>
<i>TICAM-1</i>	<i>TIR domain-containing adapter molecule (TRIF)</i>
<i>TICAM-2</i>	<i>TIR domain-containing adapter molecule (TIRP/TRAM)</i>
<i>TIRAP</i>	<i>TIR domain containing adapter protein (Mal)</i>
<i>TIRP</i>	<i>TIR-containing protein (TICAM-2/TRAM)</i>
<i>Tl</i>	<i>Toll</i>
<i>TLR 1-10</i>	<i>Toll-like receptor 1-10</i>
<i>TNF-α</i>	<i>Tumor-necrosis-factor-α</i>
<i>TRAF6</i>	<i>Tumour necrosis factor receptor-associated factor 6</i>
<i>TRAM</i>	<i>TRIF-related adapter molecule (TICAM-2/TIRP)</i>
<i>TRIF</i>	<i>TIR domain-containing adapter inducing interferon (IFN)-β (TICAM-1)</i>

Tabelle 38: Abkürzungen der verwendeten Gennamen.

7.4 Sequenzen

Im Folgenden sind die DNA-Sequenzen der Transkriptionsvarianten *NM_052813* (*Card-9*), *NM_021155* (*DC-SIGN*), *NM_197954* (*Dectin-1*), *NM_002852* (*PTX-3*), *NM_003264* (*TLR2*), *NM_003265* (*TLR3*), *NM_003266* (*TLR4*) und *NM_017442* (*TLR9*) in verkürzter Form dargestellt. In den Sequenzen sind die Bereiche markiert, wo der **forward** und **reverse Primer**, die **Fluorescin-markierte Sonde**, die **Red640-markierte Sonde** und die für RNAi-Experimente verwendeten **siRNAs** hybridisieren.

7.4.1 *Card-9* DNA-Sequenz (*NM_052813*)

```

.....
241 CTGCGGCAGT GCAAGGTCCT GAACCCCGAT GATGAGGAGC AGGTGCTCAG CGACCCCAAC
301 CTGGTCATCC GCAAACGGAA AGTGGGTGTG CTCCTGGACA TCCTGCAGCG GACCGGCCAC
361 AAGGGCTACG TGGCCTTCCT CGAGAGCCTG GAGCTCTACT ACCCGCAGCT GTACAAGAAG
.....
1021 CACCAGGAGC AGGCCAACAC CATCTTCTCC CTGCGCAAGG ACCTCCGCCA GGGCGAGGCC
1081 CGACGCCTCC GGTGCATGGA GGAGAAGGAG ATGTTTCGAGC TGCAGTGCCT GGCACACTCGT
1141 AAGGACTCCA AGATGTACAA GGACCCGATC GAGGCCATCC TGCTGCAGAT GGAGGAGGTC
1201 GCCATTGAGC GGGACCAGGC CATAGCCACG CGGGAGGAGC TGCACGCACA GCACGCCCGG
1261 GGCCTGCAGG AGAAGGACGC GCTGCGCAAG CAGGTGCGGG AGCTGGGCGA GAAGGCCGAT
1321 GAGCTGCAGC TGCAGGTGTT CCAGTGTGAG GCGCAGCTAC TGGCCGTGGA GGGCAGGCTC
1381 AGGCGGCAGC AGCTGGAGAC GCTCGTCCTG AGCTCCGACC TGGAAGATGG CTCACCCAGG
1441 AGGTCCCAGG AGCTCTCACT CCCCAGGAC CTGGAGGACA CCCAGCTCTC AGACAAAAGGC
1501 TGCCTTGCCG GCGGGGGGAG CCCGAAACAG CCCTTTGCAG CTCTGCACCA GGAGCAGGTT
1561 TTGCGGAACC CCCATGACGC AGGCCTGAGC AGCGGGGAGC CGCCCAGAGAA GGAGCGGCGG
.....

```

7.4.2 *DC-SIGN* (*CD209*) DNA-Sequenz (*NM_021155*)

```

.....
781 TGGGAATGGA CATTCTTCCA AGGAAACTGT TACTTCATGT CTAAC TCCCA GCGGAACTGG
841 CACGACTCCA TCACCGCCTG CAAAGAAGTG GGGGCCAGC TCGTCGTAAT CAAAAGTGCT
901 GAGGAGCAGA ACTTCCTACA GCTGCAGTCT TCCAGAAGTA ACCGCTTAC CTGGATGGGA
961 CTTTCAGATC TAAATCAGGA AGGCACGTGG CAATGGGTGG ACGGCTCACC TCTGTGCCC
1021 AGCTTCAAGC AGTATTGGAA CAGAGGAGAG CCCAACAACG TTGGGGAGGA AGACTGCGCG
1081 GAATTTAGTG GCAATGGCTG GAACGACGAC AAATGTAATC TTGCCAAATT CTGGATCTGC
1141 AAAAAGTCCG CAGCCTCCTG CTCCAGGGAT GAAGAACAGT TTCTTCTCTCC AGCCCTGCC
.....

```

7.4.3 *Dectin-1 (CLEC-7A) DNA-Sequenz (NM_197954)*

NM_197954 Transkript Variante 1:

```

1   AGCATAGTTT CATTTCCTGC TCTTGAATAT CTGGTTGAAC TACTTAAAGCT TAATTTGTTA
61  AACTCCGGTA AGTACCTAGC CCACATGATT TGAATCAGAG ATTCTCTTTT GTCCACAGAC
121 AGTCATCTCA GGAGCAGAAA GAAAAGAGCT CCCAAATGCT ATATCTATTC AGGGGCTCTC
181 AAGAACAATG GAATATCATC CTGATTTAGA AAATTTGGAT GAAGATGGAT ATACTCAATT
241 ACACTTCGAC TCTCAAAGCA ATACCAGGAT AGCTGTTGTT TCAGA GAAAG GATCGTGTGC
301 TGCATCTCCT CTTGGCGCC TCATTGCTGT AATTTTGGGA ATCCTATGCT TGGTAATACT
361 GGTGATAGCT GTGGTCCTGG GTACCATGGC TATTTGGAGA TCCAATTCAG GAAGCAACAC
.....
721 ATTTTGGATA GGCCTTTCTC GGCCCCAGAC TGAGGTACCA TGGCTCTGGG AGGATGGATC
781 AACATTCTCT TCTAACTTAT TTCAGATCAG AACCCACAGCT ACCCAAGAAA ACCCATCTCC
841 AAATTGTGTA TGGATTCACG TGTCAGTCAT TTATGACCAA CTGTGTAGTG TGCCCTCATA
.....

```

NM_197954 Transkript Variante 6:

```

.....
61  AACTCCGGTA AGTACCTAGC CCACATGATT TGAATCAGAG ATTCTCTTTT GTCCACAGAC
121 AGTCATCTCA GGAGCAGAAA GAAAAGAGCT CCCAAATGCT ATATCTATTC AGGGGCTCTC
181 AAGAACAATG GAATATCATC CTGATTTAGA AAATTTGGAT GAAGATGGAT ATACTCAATT
241 ACACTTCGAC TCTCAAAGCA ATACCAGGAT AGCTGTTGTT TCAGAGAAAAG GATCGTGTGC
301 TGCATCTCCT CTTGGCGCC TCATTGCTGT AATTTTGGGA ATCCTATGCT TGGTAATACT
361 GGTGATAGCT GTGGTCCTGG GTACCATGGC TGGTTTCAA GCTGTGGAAT TCAAAGGATA
421 AATTAATGAA GAAAACAAGC GGAGCTGAAG AAGAAAAGTAC AATATGGTGC TGTCTTCCTA
481 ATGAAATAAA TTCACTAAAT GGACATTA AAAAAAAAAA

```

7.4.4 *PTX-3 DNA-Sequenz (NM_002852)*

```

.....
121 ATCTCCTTGC GATTCTGTTT TGTGCTCTCT GGTCTGCAGT GTTGGCCGAG AACTCGGATG
181 ATTATGATCT CATGTATGTG AATTTGGACA ACGAAATAGA CAATGGACTC CATCCCCTG
241 AGGACCCAC GCCGTGCGAC TGCGGTCAGG AGCACTCGGA ATGGGACAAG CTCTTCATCA
301 TGCTGGAGAA CTCGCAGATG AGAGAGCGCA TGCTGCTGCA AGCCACGGAC GACGTCCTGC
361 GGGGCGAGCT GCAGAGGCTG CGGGAGGAGC TGGGCCGGCT CGCGGAAAGC CTGGCGAGGC
.....
1021 TTCCTGAGGG AGGAATCCTG CAGATTGGCC AAGAAAAGAA TGGCTGCTGT GTGGGTGGTG
1081 GCTTTGATGA AACATTAGCC TTCTCTGGGA GACTCACAGG CTTCAATATC TGGGATAGTG
1141 TTCTTAGCAA TGAAGAGATA AGAGAGACCG GAGGAGCAGA GTCTTGTCAC ATCCGGGGGA
1201 ATATTGTTGG GTGGGGAGTC ACAGAGATCC AGCCACATGG AGGAGCTCAG TATGTTTCAT
.....

```

7.4.5 TLR2 DNA-Sequenz (NM_003264)

```

.....
241  GTGTGGGTCT TGGGGGTCAT CATCAGCCTC TCCAAGGAAG AATCCTCCAA TCAGGCTTCT
301  CTGTCTTGTG ACCGCAATGG TATCTGCAAG GGCAGCTCAG GATCTTTAAA CTCCATCCC
361  TCAGGGCTCA CAGAAGCTGT AAAAAGCCTT GACCTGTCCA ACAACAGGAT CACCTACATT
421  AGCAACAGTG ACCTACAGAG GTGTGTGAAC CTCCAGGCTC TGGTGTGAC ATCCAATGGA
481  ATTAACACAA TAGAGGAAGA TTCTTTTTCT TCCCTGGGCA GTCTTGAACA TTTAGACTTA
541  TCCTATAATT ACTTATCTAA TTTATCGTCT TCCTGGTTCA AGCCCCTTTC TTCTTTAACA
601  TTCTTAAACT TACTGGGAAA TCCTTACAAA ACCCTAGGGG AAACATCTCT TTTTCTCAT
.....
1561 ATACACAGTG TAACAGGCTG CATTCCCAAG AACTTGAAA TTTTAGATGT TAGCAACAAC
1621 AATCTCAATT TATTTTCTTT GAATTTGCCG CAACTCAAAG AACTTTATAT TTCCAGAAAT
1681 AAGTTGATGA CTCTACCAGA TGCCTCCCTC TTACCCATGT TACTAGTATT GAAAAATCAGT
.....

```

7.4.6 TLR3 DNA-Sequenz (NM_003265)

```

1      CACTTTCGAG AGTGCCGTCT ATTTGCCACA CACTTCCCTG ATGAAATGTC TGGATTGGA
61     CTAAAGAAAA AAGGAAAGGC TAGCAGTCAT CCAACAGAAT CATGAGACAG ACTTTGCCTT
121    GTATCTACTT TTGGGGGGGC CTTTTGCCCT TTGGGATGCT GTGTGCATCC TCCACCACCA
181    AGTGCATGT TAGCCATGAA GTTGCTGACT GCAGCCACCT GAAGTTGACT CAGGTACCCG
241    ATGATCTACC CACAAACATA ACAGTGTTGA ACCTTACCCA TAATCAACTC AGAAGATTAC
301    CAGCCGCCAA CTTCACAAGG TATAGCCAGC TAACTAGCTT GGATGTAGGA TTTAACACCA
361    TCTCAAAACT GGAGCCAGAA TTGTGCCAGA AACTTCCCAT GTTAAAAGTT TTGAACCTCC
421    AGCACAAATGA GCTATCTCAA CTTTCTGATA AAACCTTTGC CTTCTGCACG AATTTGACTG
481    AACTCCATCT CATGTCCAAC TCAATCCAGA AAATTAATAA TAATCCCTTT GTCAAGCAGA

1921   ATAATCAGGT GTCTCTAAAG TCATTGAACC TTCAGAAGAA TCTCATAACA TCCGTTGAGA
1981   AGAAGTTTTT CGGGCCAGCT TTCAGGAACC TGACTGAGTT AGATATGCGC TTTAATCCCT
2041   TTGATTGCAC GTGTGAAAGT ATTGCCTGGT TTGTTAATTG GATTAACGAG ACCCATACCA

```

7.4.7 TLR4 DNA-Sequenz (NM_003266)

```

.....
61     GCCTGGCTGG GACTCTGATC CCAGCCATGG CCTTCTCTC CTGCGTGAGA CCAGAAAGCT
121    GGGAGCCCTG CGTGGAGACT TGGCCCTAAA CCACACAGAA GAGCTGGCAT GAAACCCAGA
181    GCTTTTCAGAC TCCGGAGCCT CAGCCCTTCA CCCCGATTCC ATTGCTTCTT GCTAAATGCT
241    GCCGTTTTAT CACGGAGGTG GTTCCTAATA TTACTTATCA ATGCATGGAG CTGAATTTCT
301    ACAAATCCC CGACAACCTC CCCTTCTCAA CCAAGAACCT GGACCTGAGC TTTAATCCCC
361    TGAGGCATTT AGGCAGCTAT AGCTTCTTCA GTTTCCAGA ACTGCAGGTG CTGGATTTAT
421    CCAGGTGTGA AATCCAGACA ATTGAAGATG GGGCATATCA GAGCCTAAGC CACCTCTCTA
481    CCTTAATATT GACAGGAAAC CCCATCCAGA GTTTAGCCCT GGGAGCCTTT TCTGGACTAT
.....
961    AAGGAAACTT GGAAAAGTTT GACAAATCTG CTCTAGAGGG CCTGTGCAAT TTGACCATTG
1021   AAGAATTCCG ATTAGCATAC TTAGACTACT ACCTCGATGA TATTATTGAC TTATTTAATT
1081   GTTTGACAAA TGTTTCTTCA TTTTCCCTGG TGAGTGTGAC TATTGAAAGG GTAAAAGACT
.....
2821   AGGGCTGCTA ATCTCAAGGA GCTTCCAGTG CAGAGGGAAT AAATGCTAGA CTAAAATACA
2881   GAGTCTTCCA GGTGGGCATT TCAACCAACT CAGTCAAGGA ACCCATGACA AAGAAAGTCA
2941   TTTCAACTCT TACCTCATCA AGTTGAATAA AGACAGAGAA AACAGAAAGA GACATTGTTC
.....

```

7.4.8 TLR9 DNA-Sequenz (NM_017442)

```

.....
541 CTGTGGGAAG GGACCTCGAG TGTGAAGCAT CCTTCCCTGT AGCTGCTGTC CAGTCTGCCC
601 GCCAGACCCT CTGGAGAAGC CCCTGCCCCC CAGCATGGGT TTCTGCCGCA GCGCCCTGCA
661 CCCGCTGTCT CTCCTGGTGC AGGCCATCAT GCTGGCCATG ACCCTGGCCC TGGGTACCTT
721 GCCTGCCTTC CTACCCTGTG AGCTCCAGCC CCACGGCCTG GTGAACTGCA ACTGGCTGTT
781 CCTGAAGTCT GTGCCCCACT TCTCCATGGC AGCACCCCGT GGCAATGTCA CCAGCCTTTC
841 CTTGTCCTCC AACCGCATCC ACCACCTCCA TGATTCTGAC TTTGCCCACC TGCCCAGCCT
901 GCGGCATCTC AACCTCAAGT GGAAGTCCCC GCCGGTTGGC CTCAGCCCCA TGCACTTCCC

.....
1081 CCTCAGCCAT ACCAACATCC TGATGCTAGA CTCTGCCAGC CTCGCCGGCC TGCATGCCCT
1141 GCGCTTCCTA TTCATGGACG GCAACTGTTA TTACAAGAAC CCCTGCAGGC AGGCACTGGA
1201 GGTGGCCCCG GGTGCCCTCC TTGGCCTGGG CAACCTCACC CACCTGTCAC TCAAGTACAA

.....
1561 CCTCCGAGTG CTGGACCTGA GTGAGAAGTT CCTCTACAAA TGCATCACTA AAACCAAGGC
1621 CTTCCAGGGC CTAACACAGC TGCGCAAGCT TAACCTGTCC TTCAATTACC AAAAGAGGGT
1681 GTCCTTTGCC CACCTGTCTC TGGCCCCTTC CTTCCGGGAGC CTGGTCCGCC TGAAGGAGCT
.....

```

8 Curriculum vitae

Zur Person

Markus Torsten Mezger

Austraße 15a, 97222 Rimpar

geboren am 22.06.1978 in Marbach am Neckar

Wissenschaftliche Anstellung

10/2004 - 12/2007	Dissertation zum Thema „Interaktion zwischen dem humanen Cytomegalievirus, <i>Aspergillus fumigatus</i> , dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten“ am Institut für Molekulare Infektionsimmunologie der Medizinischen Klinik & Poliklinik II (Prof. Dr. Einsele, PD Dr. Löffler)
02/2005 – 12/2007	Universitätsklinikum Würzburg, Med. Klinik & Poliklinik II
10/2004 - 01/2005	Universitätsklinikum Tübingen, Med. Klinik II

Studium

10/1999 - 03/2004	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim
10/2003 - 03/2004	Diplomarbeit am Institut für Genetik an der Universität Hohenheim (Prof. Dr. Preiss) zum Thema „Molekulargenetische Charakterisierung potentieller Apoptosemodifikatoren und ihre Beziehung zu Hairless in <i>Drosophila melanogaster</i> “ Fächer: Genetik, Mikrobiologie, Biochemie, Virologie Gesamtnote: sehr gut (mit Auszeichnung)

Zivildienst

1998 - 1999	Karlshöhe Ludwigsburg
-------------	-----------------------

Schulbildung

1989 - 1998	Friedrich-Schiller Gymnasium in Marbach
1985 - 1989	Grundschule in Marbach

Markus Mezger

9 Publikationen und Abstracts

Nagel AC, Maier D, Krauß S, Mezger M, Preiss A (2004) Neurogenic phenotypes induced by RNA interference with bHLH genes of the *Enhancer of split* complex of *Drosophila melanogaster*. *Genesis* **39**: 105-114

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden oder sollen in folgenden Beiträgen veröffentlicht werden:

Loeffler J, Steffens M, Arlt EM, Toliat MR, Mezger M, Suk A, Wienker TF, Hebart H, Nurnberg P, Boeckh M, Ljungman P, Trenschele R, Einsele H (2006) Polymorphisms in the genes encoding *chemokine receptor 5*, *interleukin-10*, and *monocyte chemoattractant protein 1* contribute to cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol.* **44**: 1847-1850

We analyzed 90 polymorphisms in 17 genes related to immune function for association with human cytomegalovirus (HCMV) reactivation and disease in patients after allogeneic stem cell transplantation. We found relevant markers (i) in *CCR5* and *IL-10* genes conferring a higher risk for the development of HCMV disease and (ii) in the *MCP1* gene associated with HCMV reactivation. Testing of high-risk patients for the presence of these single-nucleotide polymorphisms might be useful for individualizing antiviral prophylaxis.

Mezger M, Kneitz S, Loeffler J (2007) Gene expression profile of human dendritic cells after infection with *A. fumigatus*. *GEO* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), GSE6965

DCs are localized under the mucosa of the lungs and the gastrointestinal tract, and therefore come into close contact with *Aspergillus fumigatus* germ tubes during early steps of infection as soon as fungi become invasive. For a more detailed insight into differentially regulated genes, whole genome microarray analysis was performed.

On average, unstimulated DCs showed expression of about 13.500 genes (35% of all genes spotted on the chip). After 6 h co-cultivation of DCs and live *A. fumigatus* germ tubes, 590 genes showed a 4fold altered gene expression, if normalizing data with VSN before. Therein, a wide range of immune response genes, including genes encoding for cytokines (*IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p40*, *TNF- α*), chemokines (*CCL5*, *CCL20*, *CXCL10*), immunorelevant receptors (*TLR2*, *TLR4*, *PTX-3*), as well as costimulatory molecules (*CD40*, *CD80*, *CD83*, *CD86*) were differentially regulated.

Mezger M, Steffens M, Semmler C, Arlt EM, Zimmer M, Kristjanson GI, Wienker TF, Toliat MR, Kessler T, Einsele H, Loeffler L (2008) Investigation of Promotor Variations in Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (*DC-SIGN*) (*CD209*) and their Relevance for Human Cytomegalovirus Reactivation and Disease after Allogeneic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Microbiol Infect.* **14**: 228-234

Promoter variations in Toll-like receptor genes ($n = 7$) and genes encoding pathogen recognition and virus entry receptors ($n = 7$) were screened to detect any association with human cytomegalovirus (HCMV) reactivation and disease in patients following allogeneic stem-cell transplantation. Two single nucleotide polymorphisms (rs735240, G>A; rs2287886, C>T) in the promoter region of the *dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)* showed a significant association with an increased risk of development of HCMV reactivation and disease. Furthermore, these genetic markers influenced the expression levels of *DC-SIGN* on immature dendritic cells, as well as the infection efficiency of immature dendritic cells by HCMV, as determined by HCMV immediate-early antigen staining. Screening of patients following allogeneic stem-cell transplantation for the presence of these defined genetic polymorphisms might help to predict the individual risk of HCMV reactivation and disease.

Mezger M, Steffens M, Beyer M, Manger C, Eberle J, Toliat MR, Wienker TF, Ljungman P, Hebart H, Dornbusch HJ, Einsele H, Loeffler J (2008) Polymorphisms in the *Chemokine (C-X-C motif) ligand 10* are Associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem-Cell Transplantation and Influence *CXCL10* Expression in Monocyte-derived Dendritic Cells. *Blood* **111**: 534-536

Patients after allogeneic stem-cell transplantation (alloSCT) have an increased risk for invasive aspergillosis (IA). Here, recipients of an allograft with IA (n=81) or without IA (n=58) were screened for 84 single nucleotide polymorphisms in 18 immune relevant genes. We found 3 markers in *chemokine (C-X-C motif) ligand 10* (*CXCL10*, 4q21, 11,101 C>T, P=.007; 1642 C<G, P=.003; -1101 A<G, P=.001) significantly associated with an increased risk of developing IA. Furthermore, immature dendritic cells (iDCs) exposed to *Aspergillus fumigatus* germlings showed markedly higher *CXCL10* expression, if carrying the wild type genotype, compared with the "CGAG" high risk haplotype. In addition, serum from patients with proven/probable IA showed increased serum levels of *CXCL10*, compared with immunocompromised patients without IA. Thus, polymorphisms in *CXCL10* determine chemokine secretion by iDCs upon exposure to *A. fumigatus* and most likely thereby genetically determine the risk of IA after alloSCT.

Mezger M, Kneitz S, Wozniok I, Kurzai O, Einsele H, Loeffler J (2008) Proinflammatory Response of Immature Human Dendritic Cells is Mediated by Dectin-1 after Exposure to *Aspergillus fumigatus* Germ Tubes. *J Infect Dis.* [Epub ahead of print]

Background:

Invasive fungal infections caused by *Aspergillus fumigatus* represent a great challenge for immunocompromised patients. Pathogen detection is mediated by different receptors, including Toll-like receptors (TLRs), C-type lectins and pentraxines (PTX). However, little is known about their relevance for human immature dendritic cells (iDCs).

Methods:

Gene expression pattern of iDCs after exposure to *A. fumigatus* germ tubes was studied by whole genome microarray analysis and real-time PCR. Fungal receptors were targeted by means of small interfering RNAs (siRNAs) used to knock-down expression of *TLR2*, *TLR4*, *dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin* (*DC-SIGN*), *Pentraxin-3* (*PTX-3*), *Dectin-1* and *caspase recruitment domain family member 9* (*Card-9*).

Results:

Exposure to *A. fumigatus* induced expression of cytokines, chemokines, co-stimulatory molecules, genes involved in prostaglandin synthesis, as well as genes related to fungal recognition and phagocytosis. Silencing of *Dectin-1* resulted in reduced pro-inflammatory cytokine expression (*TNF- α* , *IL-12*), which was also reduced by anti-Dectin-1 antibody treatment prior to exposure to *A. fumigatus*, zymosan or *Candida albicans*.

Conclusion:

Dectin-1 was identified as an important receptor for *A. fumigatus* and *C. albicans* on human iDCs and was found to be involved in the induction of a pro-inflammatory cytokine response.

Mezger M, Wozniok I, Blockhaus C, Kurzai O, Hebart H, Einsele H, Loeffler J (2008) Impact of Mycophenolic Acid on the Functionality of Human Polymorphonuclear Neutrophils and Dendritic Cells during Interaction with *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Agents Chemother.* [Epub ahead of print]

The immunosuppressive agent mycophenolic acid (MPA) is clinically used to prevent graft rejection. We observed that MPA enhanced *Aspergillus fumigatus* induced oxidative burst of polymorphonuclear neutrophils and inhibited pro-inflammatory cytokine response and maturation of immature dendritic cells. Thus, MPA treatment might influence the course of *A. fumigatus* infection.

Bauerlein C, Latgé JP, Topp M, Kurzai O, Kapp M, Grigoleit GU, Killian D, Mezger M, Ebel F, Einsele H, Loeffler J. Recombinant *Aspergillus fumigatus* Antigen Asp f1 Induces Pro-Inflammatory Response and Maturation of Human Immature Dendritic Cells. *Manuskript eingereicht bei Clin Vaccine Immunol.*

Invasive Aspergillosis is a significant cause of morbidity and mortality in patients after stem cells transplantation, in solid organ transplant recipients and patients with haematological malignancies. Interaction between human immature dendritic cells (iDCs) and antigens of *Aspergillus fumigatus* is widely uncharacterized. We analyzed the inflammatory response of 4 recombinant *A. fumigatus* antigens (Asp f1, f16, crf1, cat2) on iDCs. One of these antigens (Aspf1) led to an increased expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and chemokines, to reduced expression of *IL-10*, to augmented activation of NF κ B and induced up-regulation of the DC surface molecules CD80, CD83 and CD86. The identification of Aspf1 as a potent DC stimulus might be valuable for the development of DC immunotherapeutic approaches.

Spinnler K, Mezger M, Beyer M, Wilhelm D, Einsele H, Loeffler J. Role of Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) Inhibition for Innate Immune Response of Human Dendritic Cells to *Aspergillus fumigatus*. *Manuskript in Vorbereitung*

Human dendritic cells (DCs) link innate and adaptive immune system by secretion of a broad range of pro- and anti-inflammatory cytokines after exposure to various stimuli and pathogens, including *Aspergillus fumigatus*. Dysregulation of the TH1/TH2 cytokine balance and a switch to TH2 immune response contribute to the development and unfavorable outcome of IA in animal models and clinical settings. We demonstrated that inhibition of Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) in DCs stimulated with *A. fumigatus* germlings led to markedly augmented production of IL-10 and reduced expression of IL-12 and TNF- α . Thus, GSK-3 might be an important regulator of Th1 – Th2 cytokine responses during *A. fumigatus* infection.

Loeffler J, Haddad Z, Bonin M, Schumacher U, Kapp M, Gebhardt F, Mezger M, Grigoleit GU, Stevanović S, Einsele H, Hebart H. Interaction of human monocytes with *Aspergillus fumigatus* resting and germinating conidia and hyphae. *Manuskript in Vorbereitung*

Monocytes play a major role in the cellular defense against *Aspergillus fumigatus* in immunocompromised patients. To obtain a better understanding of mechanisms involved in this interaction, phagocytosis and gene expression profiling of human monocytes after incubation with *A. fumigatus* resting and germinating conidia and inactivated hyphae (for 3, 6 and 9 h) was analyzed. The majority of monocytes phagocytosed up to 3 conidia during the first 3 hours of incubation. Microarray analysis showed an increased expression level of immune-relevant genes, dependent on the germination state of the fungus and the incubation period. Among these genes, interleukin-8, Macrophage Inflammatory Protein 3- α (CCL20) and the monocyte chemotactic protein-1 (CCL2) were found to be potential key regulators involved in *A. fumigatus*-induced immune response. In addition, *A. fumigatus* was found to be an inducer of urokinase type plasminogen activator (uPA), pentraxin-3 and Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), which might all possibly contribute to local hemorrhage and local lung tissue injury.

Kongreßposter

Mezger M, Einsele H, Loeffler J (2007) Toll-like Receptor 2 Signalling Modulates Oxidative Burst of Human Neutrophils, but Not Cytokine Response of Dendritic Cells after Contact with *Aspergillus fumigatus*. *The European Group for Blood and Marrow Transplantation (33rd EBMT, 21st-25th March)*.

Background:

Toll-like receptors (TLRs) play a crucial role for detecting conserved pathogen-associated molecular patterns comprising fungal structures. Activation of polymorphonuclear granulocytes (PMNs) as well as mobilization of antigen presenting cells is important for successful clearance of fungal infections. Here, the role of TLR2 and TLR4 for activation of PMNs and immature dendritic cells (iDCs) through *Aspergillus fumigatus* was analyzed.

Methods:

Generation of iDCs was achieved by cultivating monocytes in the presence of GM-CSF and IL-4. PMNs were obtained from fresh blood. In blocking studies, cells were preincubated with anti-TLR2 and / or anti-TLR4 antibody before stimulation with *A. fumigatus* germinating conidia. For RNA interference (RNAi) experiments, iDCs were transfected with short-interfering RNA (siRNA) via electroporation and gene expression was controlled by quantitative real-time PCR.

Results:

Oxidative Burst of PMNs was induced after contact with *A. fumigatus* or TLR2 ligand zymosan. Release of oxygen intermediates could be significantly reduced if PMNs were preincubated with anti-TLR2 antibody.

In contrast to monocytes, cytokine secretion (IL-12 and TNF- α) of iDCs was not altered if anti-TLR antibodies were used. To study the role of TLR2 and TLR4 in further detail, an RNAi system for iDCs was established to downregulate gene expression. Determination of siRNA transfection rate revealed an efficiency of about 85% and allowed significant downregulation of *TLR2* and *TLR4* (> 90%). In accordance to blocking studies, expression of *IL-10*, *IL-12* and *TNF- α* was not reduced after TLR2 or TLR4 siRNA transfection and stimulation with *A. fumigatus*.

Conclusion:

TLR2 plays an important role in the induction of the oxidative burst of PMNs whereas cytokine release of iDCs seems to be independent of TLR2 / TLR4 signalling. The established siRNA system allows detection of receptors responsible for activation of iDCs.

Loeffler J, Mezger M, Blockhaus C, Einsele H (2007) Influence of Mycophenolate on Human Granulocyte and Dendritic Cell Function in the Defense of *Aspergillus fumigatus*. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (47th ICAAC, 17th-20th September)*.

Background:

There is increasing data that certain immunosuppressive agents not only modulate lymphocyte function, but also interfere with other immune effector cells. Here, we investigated the influence of mycophenolate on the immune defence of human dendritic cells (DCs) and polymorphonuclear neutrophils (PMNs), directed against the pathogenic mould *A. fumigatus*. This mould can cause invasive aspergillosis in immunocompromised patients.

Methods:

Human monocytes were isolated by magnetic-associated cell sorting followed by differentiation into DCs with GM-CSF and IL-4. Cells were either co-cultivated with mycophenolate (10 μ g/ml), with *A. fumigatus* germ tubes (MOI=1) or both stimuli. Whole-genome microarray analysis (Affymetrix U133A) or quantitative real-time PCR assays (LightCycler, Roche) were performed to quantify differentially regulated genes. PMNs were obtained from blood using Biocoll separation. Release of reactive oxygen species (ROS) was detected photometrically by using dichlorofluorescein.

Results:

Incubation of fully differentiated DCs in the presence or absence of mycophenolate did not affect the genome expression pattern and allowed normal immune response to *A. fumigatus*. However, if cells were treated during early differentiation processes, DC development was influenced by mycophenolate resulting in increased apoptosis. We also observed subsequent reduced pro-inflammatory cytokine activity (TNF- α , CXCL10) of DCs towards fungi.

Quantification of ROS release of PMNs after phagocytosis showed that *A. fumigatus* germ tubes represent a strong stimulus for the oxidative burst which was increased at least 2 fold by mycophenolate.

Conclusion:

Mycophenolate might trigger an acute inflammatory syndrome by enhancing the *A. fumigatus* induced oxidative burst of PMNs. In addition to inhibitive effects of mycophenolate on lymphocyte proliferation, adaptive immune responses might be reduced because of a reduced number of DCs.

Loeffler J, Wozniok I, Mezger M, Kurzai O, Einsele H (2008). Immune Response Mechanisms of Human Polymorphonuclear Neutrophils against *Aspergillus fumigatus*. *The European Group for Blood and Marrow Transplantation (34th EBMT, 30th March – 2nd April).*

Background:

Invasive fungal infections of immunocompromised patients with the opportunistic mycopathogen *Aspergillus fumigatus* show an increasing incidence for the last decade due to the growing number of stem cell transplantations. Many efforts have been undertaken to reveal immune mechanisms that control clearance of *A. fumigatus* from blood. Polymorphonuclear neutrophils (PMNs), as a part of the innate immunity, recognize fungal pathogens at an early step after infiltration. Besides phagocytotic mechanisms, PMNs attack pathogens by the release of reactive oxygen species (ROS).

Methods:

In the current study, human PMNs were isolated from fresh blood of healthy donors by the use of Bicol separating solution and oxidative burst was determined in a kinetic measurement by the use of dichlorofluorescein. We could demonstrate that *A. fumigatus* germlings of the clinical relevant strain ATCC 9197 represented a strong stimulus for the release of ROS. At the same time, PMNs actively tracked germlings and directly attached to fungi as demonstrated by real-time microscopy.

Results:

Co-cultivation of PMNs with *A. fumigatus* germ tubes resulted in a strong upregulation of genes (*hämoxxygenase*, *heat shock 70kDa protein HSPA8*, *thioredoxin*, *HSPA1B*, *HSP90AB1*, *Ferritin*), involved in self-protection against radicals, as identified by whole genome expression analyses (Affymetrix U133 Plus 2.0 Array). In total, unstimulated PMNs showed expression of approximately 7.500 genes (20% of all genes spotted on the chip). After 6h co-cultivation of PMNs and *A. fumigatus* germ tubes, 195 (1.273) genes showed an at least 4fold (2fold) altered gene expression. Therein, 4 genes encoding for modulating factors of inflammatory responses (*IL-8*, *CCL3*, *CXCL2*, *IL1RN*) were significantly upregulated. Luminex analysis was performed for TNF- α , IL-12, GM-CSF, IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10 and IL-1 β to identify secreted cytokines, thereby confirming array data and revealing IL-8 to be strongly released (5fold) by PMNs after fungal co-culturing.

Conclusion:

In conclusion, *A. fumigatus* had a substantial effect on the activity of human PMNs when coming in close contact. In consequence, various defence strategies were activated, including phagocytoses, ROS release and mobilization of other immune effector cells by secretion of chemoattractant cytokines. A better understanding of innate immune defense mechanisms may provide new directions for antifungal therapies.